

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MARTA VALÉRIA GUIMARÃES DE SOUZA HOFFMANN**

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *BYSSOCHLAMYS NIVEA* E  
*TALAROMYCES FLAVUS* EM SUCO DE MAÇÃ**

**FLORIANÓPOLIS (SC), 2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *BYSSOCHLAMYS NIVEA* E  
*TALAROMYCES FLAVUS* EM SUCO DE MAÇÃ**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Maria F. de Aragão

**FLORIANÓPOLIS (SC), 2004**

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório do Departamento de Engenharia Química na Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, SC.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

**A DEUS**, Ser Supremo.

**AMARILDO**, Companheiro.

**IGOR E GUSTAVO**, Razões de minha Vida.

**NANINHA**, Segunda Mãe de meus Filhos.

**MEU PAI**, Incentivador.

**MINHA MÃE**, Intercessora.

## **AGRADECIMENTOS**

Profª Gláucia Maria Falcão Aragão pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

A Profª Maria Lúcia Cochlar, Coordenadora do Curso de Engenharia Química – UNISUL, pelo apoio e incentivo.

A Direção do Centro de Ciências Exatas, Agrárias e das Engenharias e CENTEC, pela disponibilidade do laboratório para o desenvolvimento experimental.

Ao aluno Moisés pela amizade e apoio técnico.

Ao aluno Rafael, pela voluntariedade.

Aos funcionários do CENTEC pela colaboração.

Bia, pela determinação do tempo de controle.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
3.1 Maçã .....	15
3.1.1 O Cultivo .....	15
3.1.2 Florada da Maçã .....	15
3.1.3 A Colheita.....	16
3.1.4 Processo de Produção.....	16
3.1.5 A Cultura da Maçã .....	17
3.1.6 As Cultivares .....	17
3.1.7 A Maçã e seu Valor Alimentar .....	19
3.1.8 Suco de Maçã .....	20
3.2 Fungos Filamentosos Termo-Resistentes .....	22
3.3 Incidência.....	23
3.4 Resistência Térmica.....	24
3.5 Fatores que aumentam a Termo-Resistência .....	31
3.5.1 Temperatura de crescimento .....	31
3.5.2 Potencial Hidrogeniônico (pH) .....	31
3.5.3 Idade do esporo.....	32
3.5.4 Ácidos Graxos .....	34
3.5.5 Ácidos Orgânicos.....	34
3.5.6 Altas concentrações de solutos no meio.....	35
3.6 Ativação Térmica.....	36
3.7 Pressão .....	38
3.8 Outras Considerações de Fungos Filamentosos .....	39
3.9 Produção de Metabólitos.....	40
3.9.1 Produção de Enzimas .....	41
3.9.2 Produção de Micotoxinas .....	42
3.10 Espécies de Fungos Termo-resistentes.....	45
3.10.1 Gênero Byssochlamys: Byssochlamys fulva e Byssochlamys nivea .....	45
3.10.2 Gênero Talaromyces: Talaromyces flavus.....	49
3.11 Cinética da Inativação Térmica (Método de Linearização de Alderton & Snell, 1970).....	51
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
4.1 Matéria prima e Amostragem .....	54
4.2 Seleção das Culturas .....	54
4.3 Produção de Ascósporos .....	55
4.4 Coleta dos Ascósporos .....	56

4.5 Ativação dos Ascósporos .....	57
4.6 Determinação do Tempo de Elevação da Temperatura .....	57
4.7 Determinação da Resistência Térmica .....	58
4.7.1 Métodos de Tubos TDT .....	58
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	 60
5.1 Produção de Estrutura de Resistência.....	60
5.2 Avaliação Microscópica.....	61
5.3 Avaliação da Resistência Térmica de Ascósporos de <i>Byssochiamys Nívea</i> em Suco de Maçã .....	62
5.4 Avaliação da Resistência Térmica de Ascósporos <i>Talaromyces Flavus</i> em Suco de Maçã .....	71
 6 CONCLUSÃO .....	 84
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 86
 ANEXOS .....	 99

## LISTA DE ABREVIATURAS

$a$	1/ inclinação
$a_w$	Atividade da água
B.D.A.	Agar batata dextrose
$C$	Constante e intercepto da curva linearizada
$D$	Tempo de morte térmica
$K$	Constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada) ( $m^1$ )
$N$	Número de sobreviventes/mL após um tempo de tratamento térmico a uma dada temperatura
$N_0$	Número inicial de ascósporos/mL
$Ph$	Potencial hidrogeniônico
$r^2$	Coeficiente de correlação
TDT	Tempo de morte térmica
UFC	Unidade formadora de colônias
$Z$	Número de graus necessários para causar uma diminuição de 1 ciclo logarítmico no valor de $D$ .



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS .....	29-30
TABELA 2 – CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA A ESPORULAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	56
TABELA 3 – TEMPO NECESSÁRIO P/ OBTENÇÃO DAS TEMPERATURAS DE INTERESSE NO INTERIOR DO TUBO TDT.....	58
TABELA 4 – TEMPERATURAS E TEMPOS DE AQUECIMENTO UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DAS CEPAS SELECIONADAS ESTUDADAS.....	59
TABELA 5.– CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DE <i>Byssochlamys nivea</i> e <i>Talaromyces flavus</i> (UFC/mL) NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO.....	61
TABELA 6 – VALORES DE K, 1/K E $r^2$ CALCULADOS PARA CADA TEMPERATURA DE TRABALHO COM <i>Byssochlamys nivea</i> .....	66
TABELA 7 – VALORES DE 1/K, D E SEUS RESPECTIVOS $R^2$ AQUECIDOS A 85°C.....	69
TABELA 8 – VALORES DE D CALCULADOS PARA CADA TEMPERATURA DE TRABALHO COM <i>Talaromyces flavus</i> INCUBADOS A 20 E 30°C .....	76
TABELA 9 – VALORES DE K, 1/K E $r^2$ CALCULADOS PARA CADA TEMPERATURA DE TRABALHO COM <i>T. FLAVUS</i> .....	78
TABELA 10 – VALORES DE D, 1/K E $R^2$ , OBTIDOS PELOS MÉTODOS DE LINEARIZAÇÃO POR REGRESSÃO LINEAR E LINEARIZAÇÃO POR ALDERTON & SNELL (1970) PARA <i>T. flavus</i> .....	83

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLORADA DA MAÇÃ .....	16
FIGURA 2 – MAÇÃ GALA .....	18
FIGURA 3 – MAÇÃ FUGI .....	19
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE SUCO DE MAÇÃ PLOPOSO (NÉCTAR DE MAÇÃ) .....	21
FIGURA 5 – Curva de sobreviventes de ascos de <i>B. nívea</i> , produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 85°C. ....	64
FIGURA 6 – Cálculo de “a” para <i>B. nívea</i> (20°C) aquecido a 85°C .....	65
FIGURA 7 - Cálculo do expoente “a” para <i>B. nívea</i> (30°C) aquecido a 85°C. ....	66
FIGURA 8 - Curva de sobreviventes de ascos de <i>B. nívea</i> produzidos a 20°C linearizadas.....	67
<b>FIGURA 9 – CURVA DE SOBREVIVENTES DE ASCOS DE <i>B. NÍVEA</i> PRODUZIDOS A 30°C LINEARIZADAS</b> .....	<b>68</b>
FIGURA 10 – Curva de sobreviventes de ascos de <i>B. nívea</i> aquecidos a 85°C e linearizadas por regressão linear .....	70
FIGURA 11 – Curvas de sobreviventes de ascosporos de <i>T. flavus</i> produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 80°C e linearizados por regressão linear.....	73
FIGURA 12 – Curva de sobreviventes de ascosporos de <i>T. flavus</i> produzidos a 20 e 30°C e aquecidos a 85°C .....	74
FIGURA 13 – Curva de sobreviventes de ascosporos de <i>T. flavus</i> produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 90°C .....	75
FIGURA 14 - Cálculo do valor de Z para <i>T. flavus</i> produzidos a 20 e 30°C... ..	77
FIGURA 15 – Cálculo do valor de “a” para <i>T. flavus</i> a 80°C .....	79
FIGURA 16 – Curva de sobreviventes de ascósporos de <i>T. flavus</i> produzidos a 20 e 20°C, aquecidos a 80°C e linearizadas .....	80
FIGURA 17 – Curva de sobreviventes de ascósporos de <i>T. flavus</i> produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 85°C e linearizadas.....	81
FIGURA 18 – Curva de sobreviventes de ascósporos de <i>T. flavus</i> produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 90°C e linearizadas .....	82

## RESUMO

Os esporos de fungos filamentosos termo-resistentes não só resistem às temperaturas de pasteurização de sucos e derivados de frutas, como são ativados por tratamento térmico germinando e provocando a deterioração destes produtos. Este trabalho tem como objetivo o estudo da resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. Duas temperaturas de incubação foram utilizadas (20 e 30°C), possibilitando o estudo da influência deste parâmetro na resistência térmica destes fungos. Os esporos foram submetidos a diferentes tratamentos térmicos para avaliação da resistência térmica em tubo TDT – Thermal Death Time, usando como meio suco de maçã a 12° Brix com pH = 3,2, como meio de aquecimento. Os resultados obtidos mostraram, para ambos os fungos, uma resistência térmica maior, quando estes foram produzidos a temperaturas maiores de incubação (30°C). Entre os dois fungos filamentosos estudados, o *Byssochlamys nivea* se mostra o mais resistente com um comportamento não linear da curva de sobreviventes. O *Talaromyces flavus* apresentou um comportamento praticamente linear da curva de sobreviventes. Os valores mais elevados obtidos para parâmetro equivalente a D (l/k) para o *Byssochlamys nivea* e D para o *Talaromyces flavus*, produzidos a 30°C, foram respectivamente de l/k (85°C) = 90,9 min e  $D_{85^{\circ}\text{C}} = 12,89$  min. Estes valores confirmam a maior resistência térmica do *Byssochlamys nivea* e mostram que ambas as linhagens poderiam sobreviver ao tratamento térmico de pasteurização normalmente aplicado para suco de maçã (90-92°C por 20-60 segundos). Portanto, o método de prevenção ainda é a melhor solução para eliminação de fungos filamentosos termo-resistentes, como os estudados neste trabalho.

## ABSTRACT

The heat-resistant fungi not only resist to the temperatures to pasteurization of juices and derived of fruits, how are activated by treatment germinating and provoking the deterioration of these products. This work has as objective the study of the thermal resistance of *Byssoschlamys nivea* and *Talaromyces flavus* in apple juice. Two incubation temperatures were used (20 and 30°C) to study the influence of this parameter in the thermal resistance of fungi. The spores were submitted to different thermal treatments for evaluation of the thermal resistance in TDT - Thermal Death Time, using apple juice (12° Brix; pH = 3,2) as heating medium. The obtained results showed for both fungi a larger thermal resistance, when these were produced in larger temperatures of incubation (30°C). Between the two studied filamentous fungi, the *Byssoschlamys nivea* showed the highest resistance, without a behavior lineal of the survivors' curve. The *Talaromyces flavus* presented a behavior practically lineal of the survivors' curve. The highest values obtained for equivalent parameter D (1/k) for the *Byssoschlamys nivea* and D for the *Talaromyces flavus*, produced for 30°C, were respectively of  $1/k (85^{\circ}\text{C}) = 90,9 \text{ min}$  and  $D_{85^{\circ}\text{C}} = 12,89 \text{ min}$ . These values confirm the largest thermal resistance of the *Byssoschlamys nivea* and they show that both strains could usually survive the thermal treatment applied to pasteurize the apple juice (90-92°C for 20-60 seconds). Therefore, the prevention method is still the best solution for elimination of heat-resistant, as that filamentous fungi studied in this work.

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos, na sua maioria, são pouco resistentes ao calor, uma vez que este destrói facilmente conídios e hifas. As poucas espécies termo-resistentes produzem esclerócios ou ascósporos (esporos formados sexualmente no interior de estrutura, chamados de ascos), sendo que a maior parte das deteriorações em alimentos provocadas por elas são devido à sobrevivência de ascósporos ao tratamento de pasteurização (SPLITTSTOESSER et al, 1991). Devido à grande incidência de fungos termo-resistentes em alimentos e à preocupação com diversos danos que estes microrganismos podem causar, trabalhos têm sido realizados para a avaliação da ocorrência destes fungos filamentosos.

Estes esporos de fungos não resistem somente às temperaturas empregadas no processamento térmico destes sucos e derivados de frutas (BEUCHAT, 1986; MURDOCK & HATCHER, 1978; SPLITTSTOESSER et al, 1971, KOTZEKIDOU, 1997), como também são ativados por este tratamento (BEUCHAT, 1986), levando ao aumento da germinação e seu crescimento no produto final (MURDOCK & HATCHER, 1978). Seus esporos apresentam resistência diferente dos esporos dos fungos filamentosos, como o *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Fusarium*, aquecidos a 60°C por 5 minutos (TOURNAS, 1994).

Os primeiros estudos sobre a resistência térmica de fungos foram feitos por OLLIVER & RENDLE (1933), identificando o *Byssochlamys fulva* como uma espécie termo-resistente. As espécies de fungos filamentosos termo-resistentes

mais freqüentemente envolvidas na deterioração de alimentos são *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* (MAGGI et al, 1994; SPLITTSTOESSER et al, 1991; TOURNAS, 1994). Estas espécies são responsáveis pela deterioração de frutas processadas e produtos derivados (TOURNAS et al, 1994).

A principal característica dos fungos termo-resistentes é a formação de ascósporos (esporos formados sexualmente no interior de estruturas chamadas ascos) que são muito resistentes. A forma e ornamentação desses esporos podem variar com o tipo, as espécies e linhagens de microrganismos (SPLITTSTOESSER, 1992).

Os fungos termo-resistentes, além da resistência às altas temperaturas, podem ser resistentes às altas concentrações de peróxido de hidrogênio, irradiação, baixos pH, baixas concentrações de oxigênio e baixas atividades de água ( $a_w$ ). Alguns fatores podem aumentar a termo-resistência como a idade do esporo, presença de solutos no meio, ácidos graxos e ácidos orgânicos (DOYLE & MARTH, 1975a; CONNER & BEAUCHAT, 1987a; BANNER et al., 1979; SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER, 1977).

Outro fator preocupante é a produção de toxinas por esses fungos termo-resistentes, principalmente nos produtos derivados de frutas. O gênero *Byssochlamys* pode produzir a patulina, ácido bissoclâmico, bissotoxina A, assimetrina e variotina. Certas linhagens de *Neosartorya fischeri* são capazes também de produzir toxinas como as fumitremorginas A, B e C e verruculogena. Estes compostos podem agir no sistema nervoso central provocando tremores, convulsões e morte em animais. (TOURNAS 1994).

Sabemos que o estado de Santa Catarina é grande produtor de maçã, produzindo 490.000 das 900.000 toneladas produzida no Brasil no ano de 2000, surgindo o interesse de avaliar a resistência térmica de fungos no suco desta fruta.

## 2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo avaliar a resistência térmica de fungos filamentosos termo-resistentes *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã, utilizado como meio de aquecimento dos esporos. Espera-se que os resultados encontrados auxiliem no estabelecimento de processos térmicos em sucos de maçã da região.



### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Maçã**

##### **3.1.1 O Cultivo**

As condições climáticas favoráveis são essenciais para a produtividade da macieira, limitando seu plantio nas regiões de clima frio. O ideal para uma boa safra e de qualidade, é que se tenha aproximadamente 800 horas de frio, com temperaturas inferiores a 7,2°C.

A macieira precisa ser podada tecnicamente para ter seu desenvolvimento normal e receber uma boa insolação. Tanto a poda quanto o raleio que consiste na retirada do excesso de frutas é na verdade um trabalho artesanal ([www.fraiburgo.sc.gov.br](http://www.fraiburgo.sc.gov.br)).

##### **3.1.2 Florada da Maçã**

A florada da maçã (Figura 1) ocorre normalmente entre os meses de setembro e outubro.



Figura 1 – FLORADA DA MAÇÃ

### **3.1.3 A Colheita**

A colheita da maçã é feita manualmente. Ao ser colhida é posta em uma sacola. Quando está cheia é aberta por baixo, depositando suavemente a fruta em recipiente grande de madeira chamado "bin" (caixas para aproximadamente 400Kg de maçãs). A colheita inicia-se no final de janeiro, perdurando até o começo de maio, de acordo com as variedades cultivadas. ([www.fraiburgo.sc.gov.br](http://www.fraiburgo.sc.gov.br)).

### **3.1.4 Processo de Produção**

A macieira é uma cultura perene. Começa a produzir plenamente no 5º ano e vai até o 25º ano, quando é feita a renovação do pomar.

### **3.1.5 A Cultura da Maçã**

Conta a história que a evolução da macieira teve como centro de origem a região do leste da China há 25 milhões de anos. Presume-se, no entanto, que o desenvolvimento das espécies atuais tenha iniciado após o final da última era glacial, portanto, há 20.000 anos.

possivelmente, o cultivo das macieiras tenha se originado naquela região e as migrações dos povos euro-asiáticos devem ter colaborado para a disseminação das formas primitivas das macieiras atuais. ([www.fraiburgo.sc.gov.br](http://www.fraiburgo.sc.gov.br)).

A pomicultura brasileira iniciou-se em 1926, no município de Valinhos no estado de São Paulo, mas, no entanto, o cultivo da macieira em escala comercial foi iniciado a partir da década de 1960. Em Santa Catarina, provavelmente um dos primeiros pomares a ser implantado foi no município de Bom Jardim da Serra. A implantação data de 1940. A partir de 1963, se deu o início dos plantios comerciais no município de Fraiburgo. ([www.fraiburgo.sc.gov.br](http://www.fraiburgo.sc.gov.br)).

### **3.1.6 As Cultivares**

O número de cultivares de macieira é muito grande. São obtidos por meio de trabalhos de melhoramento genético.

É de fundamental importância ao se planejar um pomar escolher as cultivares que mais se adaptem ao clima e que tenham uma boa aceitação no mercado. As cultivares mais plantadas a nível de produtor são: Gala e Fuji.

## **GALA**

Originária da Nova Zelândia, o fruto é de tamanho médio, forma arredondada/cônica. A epiderme é rajada, com faixas vermelho-claras, e fundo amarelado, lisa, lustrosa, muito atrativa. A cavidade peduncular é média e simétrica, com pedúnculo longo e fino. O cálice é pequeno e fechado.

A polpa é de coloração creme, firme, suculenta. O aroma é de médio a forte, sabor doce e de excelente qualidade. A maturação é semiprecoce nas regiões mais quentes, retardando-se nas mais frias. O período de colheita vai da segunda quinzena de janeiro até a segunda quinzena de fevereiro. Existe ainda mutações da gala que, por terem maior coloração, o valor comercial é maior, são elas: Gala Colorida, Royal Gala, Imperial Gala, Mondial Gala, dentre outras. ([www.fraiburgo.sc.gov.br](http://www.fraiburgo.sc.gov.br)).



Figura 2 – MAÇÃ GALA

## FUJI

Proveniente do Japão, o fruto é de tamanho médio a grande, arredondado, com cavidade peduncular média, pouco profunda, cálice grande, fechado e pedúnculo médio. Nas regiões com temperaturas hibernais mais amenas, o fruto tende a ser mais achatado, assimétrico e de tamanho menor.

A epiderme é rajada, com faixas vermelhas e fundo verde-amarelado, lustrosa, lisa. Várias pesquisas têm sido conduzidas objetivando a melhoria da coloração do fruto da Fuji, especialmente por melhoristas Japoneses.

A polpa é amarelo-clara, firme, quebradiça, muito succulenta. É doce, com boa acidez e sabor excelente. A maturação é tardia, estendendo-se até a primeira quinzena de maio. Excelente conservação em câmaras frias convencionais, em atmosfera controlada chega a 9/10 meses de conservação. A colheita da Fuji é realizada durante o mês de abril. ([www.fraiburgo.sc.gov.br](http://www.fraiburgo.sc.gov.br)).



Figura 3 – MAÇÃ FUJI

### 3.1.7 A Maçã e seu Valor Alimentar

A maçã, além de visualmente muito atrativa, de sabor delicioso e consumo amplamente desejado, apresenta um valor nutricional como alimento invejável perante outras frutas. Uma maçã (bem nutrida) com mais ou menos 100 gramas oferece os seguintes teores de nutrientes e vitaminas para os mais variados sistemas do corpo humano:

**Para o Cérebro e Memória :**

*Fósforo (8mg)*

**Para o Coração e Sangue:**

*Cobre (0,10 mg), Ferro (0,23 mg) e baixo teor de Lipídios (0,4g)*

**Para a Digestão e Intestinos:**

*Celulose (1 g)*

**Para os Rins:**

*Potássio (135 mg)*

**Para os Ossos:**

*Cálcio (4 mg)*

**Para os Músculos:**

*Carbohidratos (13,8 mg)*

**Para todo o Organismo:**

*Sódio (2 mg), Vitamina A (0,03 mg), Vitamina B (0,04 mg) e Vitamina C (4 mg)*

Fonte: Balbach A – As Frutas na Medicina Doméstica, 1999.

### **3.1.8 Suco de Maçã**

A figura 4 apresenta um fluxograma do processamento do suco de maçã (Associação Brasileira dos produtores de Maçã):

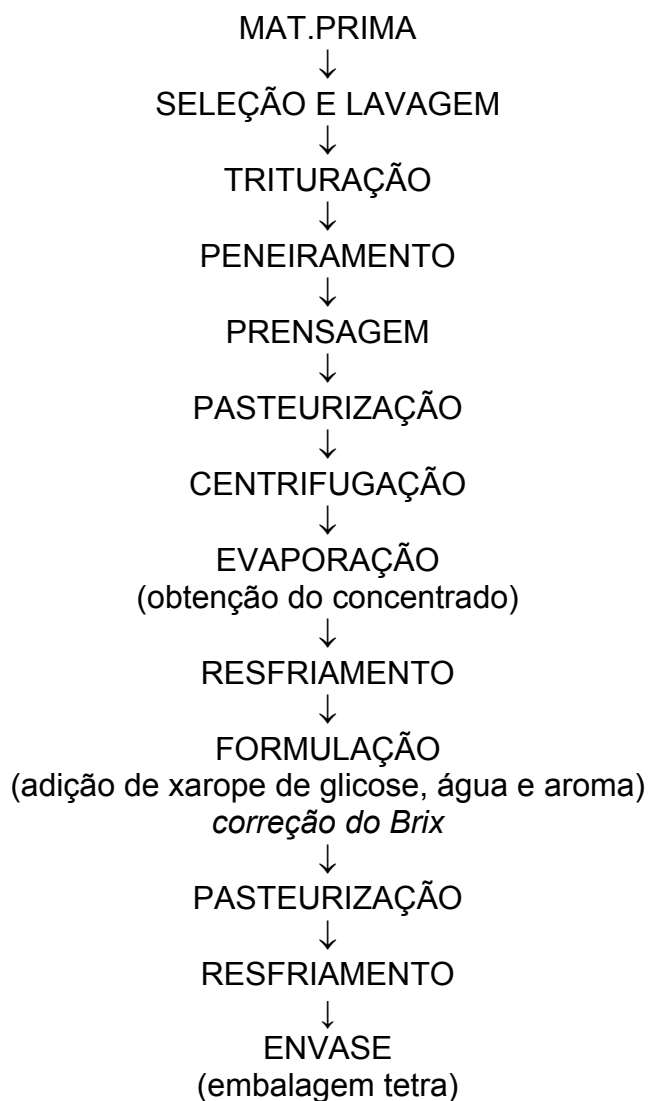


Figura 4 – FLUXOGRAMA DE SUCO DE MAÇÃ POLPOSO (NÉCTAR DE MAÇÃ)

Como subproduto, obtém-se o bagaço da maçã que é utilizado para consumo animal. A maçã é selecionada e processada dentro dos mais rigorosos critérios técnicos.

### 3.2 Fungos Filamentosos Termo-Resistentes

Os fungos do sub - reino *Ascomicotina* são chamados “*Ascomicetos*” pois produzem suas estruturas reprodutivas, ascósporos, dentro de um saco chamado asco. Na maioria dos fungos, o núcleo existe no estado haplóide. Em um ponto do ciclo de vida do ascomiceto são produzidos núcleos diplóides por fusão nuclear. Este núcleo sofre meiose dentro do asco, seguido por uma divisão mitótica e então sofrem diferenciação em oito ascósporos haplóides. Quando os ascósporos amadurecem, os ascos sofrem ruptura e estes são liberados. Os ascósporos possuem parede fina, altamente refratáveis e são geralmente ornamentados (GUMERATO, 1995).

Muitos fungos termo-resistentes têm sido causadores de deterioração de frutas e seus produtos. Os principais pertencem aos gêneros *Neosartorya*, *Byssochlamys*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*. São fungos telomórficos, ou seja, apresentam reprodução sexuada produzindo ascos com oito ascocarpos. Os ascos desenvolvem-se no interior de ascósporos que podem apresentar formas variadas: o cleistotécio (uma membrana rígida que se apresenta envolvendo vários ascos), como o apresentado pelo gênero *Eupenicillium spp* e *Neosartorya spp* e o gimnotécio (um emaranhado frouxo de hifas, onde se localizam os ascos), como apresentado pelo gênero *Talaromyces spp* (HOCHING & PITT, 1984). O asco do gênero *Byssochlamys*, apesar de apresentar uma elevada resistência térmica, não se encontra protegido por ascoma.



### 3.3 Incidência

Os primeiros trabalhos com fungos filamentosos realizados por CARTWRIGHT & HOCKING (1984) apresentam métodos de prevenção de fungos termo-resistentes em alimentos e detectaram, além de *Byssochlamys spp* a presença de fungos pertencentes aos gêneros *Eupenicillium*, *Neosartorya* e *Talaromyces*. KAVANAGH et al. (1963) isolaram uma cepa de *Aspergillus* a partir de morango enlatado, tratado a 100°C por 12 minutos, posteriormente identificado como *Aspergillus malignus*, em sinonímia com *Aspergillus fischeri* var. *spinosus* e *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*.

Vários fungos termo-resistentes foram isolados de produtos comerciais. Um exemplo seria os isolados por KING et al. (1969) dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Pullularia*, isolados de suco de uva. VICINI et al. (1983) isolaram a partir de suco de pêra e tomate deteriorados em embalagens Tetrabrik®, o fungo *Mucor spinescens*, que produzia esporos com baixa termo-resistência e *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*.

Segundo estudos de SPLITTSTOESSER et al (1971), citado por ARAGÃO (1989), observaram a presença de fungos termo-resistentes em pomares e vinhedos, no estado de Nova York. Das amostras analisadas, verificaram que mais de 70% estavam contaminadas principalmente com *Byssochlamys fulva*.

Vários outros trabalhos relatam o isolamento de fungos termo-resistentes em diversos produtos como *Penicillium citrinum* isolado de maçã e cidra (SWANSON et al. (1985); *Byssochlamys spp.*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium expansum* de

sucos de frutas (DRAGONI & COMI, 1985); *Talaromyces flavus* em suco de frutas comerciais.

(SCOTT & BERNARD, 1987); fungo *Mucor spinescens* em suco de laranja deteriorado (SPOTTI & CASOLARI 1987); *Neosartorya fischeri* à partir de sucos comerciais (SCOTT & BERNARD, 1987); *Talaromyces flavus* em de suco de abacaxi (KING & HALBROOK, 1987).

ARAGÃO (1989), isolou 58 culturas de fungos termo-resistentes a partir de 15 amostras de polpa de suco dos gêneros *Byssoschlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium* SPOTTI et al (1992) isolaram *B. nivea*, *B. fulva* e *T. flavus* de tomate in natura. ENGEL e TEUBER (1991) isolaram *B. nivea* em leite cru e pasteurizado integral e KOTZEKIDOU (1997) isolaram *B. fulva*, *B. nivea* e *N. fischeri* de massa de tomate.

### 3.4 Resistência Térmica

Vários pesquisadores têm feito estudos sobre a resistência-térmica em diferentes espécies de fungo.

CONNER D.E. BEAUCHAT, L.R. (1987a) verificaram um aumento da inativação térmica de ascósporos de *Neosartorya fischeri* com a adição no meio de aquecimento do ácido fumárico, seguido do ácido cítrico, málico e tartático. Demosntraram ainda que a letalidade produzida por ácidos orgânicos é influenciada simultaneamente pelo pH e pelo tipo e concentração da forma não dissociada do ácido orgânico.

CASELLA et al (1990) observaram que os ascósporos de *Byssoschlamys nivea* mais velhos (16 semanas) eram mais resistentes ao tratamento térmico do que os mais jovens (8 semanas), dependendo do tipo substrato usado . Quando utilizado um meio muito nutritivo como o MEA (extrato de malte e agar) esse fato ocorreu com a incubação nas temperaturas de 25 e 35°C, já quando usado um menos nutritivo como PDA (ágar batata dextrose) foi observado somente com a incubação a 35°C.

OBETA & UGWUANYI (1994) ao inocularem com ascósporos de *Neosartorya fischeri* e *N. fischeri var.spinosa*, sucos de manga, laranja e abacaxi contendo várias concentrações de sucrose (9% para o suco de manga, 30% para o suco de abacaxi e 31,5% para o suco de laranja), pasteurizado a 80°C por 30min e armazenados entre 4 – 5°C durante 64 dias, observaram que a adição de sucrose protegeu significamente os ascósporos da inatividade durante o armazenamento a frio.

O xarope de sucrose foi adicionado para compensar as diferenças no percentual de sólidos solúveis em cada tipo de suco de fruta.

O mesmo foi observado por SPLITTSTOESSER et al (1989) quando investigaram a termoresistência do fungo identificado como *Eurotium herbariorum*, isolado de geléia de uva. Este fungo teve um crescimento ótimo em meio contendo 40 a 60% de sacarose. Em suco de uva 5° BRIX, os valores de D (70°C) e Z foram 2.5 minutos e 9.1°C enquanto que em suco de uva 65° BRIX os valores de D (70°C) e Z foram 5.2 minutos e 7.1°C. Os aumentos da quantidade de sólidos solúveis no meio de aquecimento protegem os ascósporos contra inativação térmica.

BAYNE & MICHENER (1979), observaram que *T. flavus* apresenta, de maneira geral, menos resistência que o *B. fulva*, embora resista às temperaturas normalmente aplicadas no processamento térmico do suco, podendo vir a causar

deterioração. KATAN (1985), trabalhando também com *T. flavus*, observou rápida destruição de 9 linhagens deste fungo, com inativação de  $10^6$  ascósporos em 20 minutos de aquecimento a 80°C. Enquanto KING & HALBROOK (1987), verificaram que o tempo para redução de 3 ciclos logarítmicos na população inicial de *T. flavus*, em meio sintético pH 5,0, variava entre 97 e 236 minutos a 80°C; 32 a 36 minutos a 85°C e 5 a 12 minutos a 90°C.

Analisando os esporos assexuais dos gêneros mais comuns como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Fusarium* TOURNAS (1994), concluiu que são mortos quando expostos a temperaturas de 60°C durante cinco minutos.

BEUCHAT (1986) trabalhando com *T. flavus*, *N. fischeri* e *B. sp*, avaliou a resistência térmica desses fungos em tampão fosfato 0.1M e pH 7.0 e em vários produtos de frutas, observando que, de três linhagens de *T. flavus* testadas, duas foram mais resistentes que os demais fungos, tanto em tampão fosfato quanto nos produtos de fruta. Determinou valores D a 91°C, para as duas linhagens mais resistentes de *T. flavus*, que variaram de 2,9 a 11,7 minutos, sendo que a linhagem menos resistente apresentou um valor D máximo igual a 2,2 minutos a 79°C. As linhagens de *N. fischeri* apresentaram entre si, praticamente a mesma resistência, com valor D a 91°C, menor que 2,0 minutos. *B. spp* não se mostraram muito resistentes, apresentando valores D superiores a 2,0 minutos somente em temperaturas abaixo de 77°C. Em produtos de morango, o D para *T. flavus* a 91°C variou de 3,9 a 11,7 minutos e para *N. fischeri* foi menor que 2 minutos, à mesma temperatura.

SCOTT & BERNARD (1987) trabalhando com suco de maçã, observaram que a resistência térmica do *T. flavus* e *N. fischeri* eram comparável a de *B. fulva*, o

obtendo para *T. flavus* um D igual a 200 minutos a 80°C, enquanto para *N. fischeri* o valor D foi de aproximadamente 4,6 minutos a 85°C.

CONNER & BEUCHAT (1987b) trabalhando com *N. fischeri*, observaram que o tipo de meio de cultura utilizado para esporulação não afetava a termo-resistência dos ascósporos, porém não foi observado o mesmo para o meio de suspensão para aquecimento dos ascósporos. Uma suspensão com  $10^6$  ascósporos/mL foi inoculada no suco de maçã, a 12,3° Brix, em pH 3,8. Após aquecimento de 30 minutos a 90°C ainda houve ascósporos sobreviventes. Esta sobrevivência não foi observada quando os ascósporos foram aquecidos em suco de uva a 16,6° Brix, em pH 3,4. Os autores consideraram que este fato indicava que o pH, conteúdo de sólidos solúveis e conteúdo de ácidos orgânicos poderiam influenciar na resistência dos ascósporos a altas temperaturas.

Em relação às variações da termo-resistência de fungos com componentes do meio de aquecimento, vários trabalhos têm sido realizados. ARAGÃO (1989) observou uma diminuição da resistência térmica de ascos de *B. nivea* quando submetidos à temperatura de 85°C associado a 0,1% de benzoato de sódio. RAJASHEKHARA et al. (1996) verificaram que a resistência térmica de *N. fischeri* aumentou em até quatro vezes quando o teor de sólidos solúveis no alimento variou de 10 a 45° Brix.

SPLITTSTOESSER & CHUREY (1991) observaram que, a adição de 100mg/L de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) em suco de frutas reduz em 50% a resistência ao calor de ascósporos de *N. fischeri* e que com o aumento do pH de 3,0 para 5,0, o efeito do SO<sub>2</sub> sobre a redução de termo-resistência diminui.

Segundo tabela abaixo, apresentada por DELGADO (2001), verifica-se a determinação dos parâmetros de resistência térmica em fungos, utilizando sucos de frutas e outros meios de aquecimento.

**TABELA 1 – PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS**

<b>Autor</b>	<b>Fungo</b>	<b>Valor de D T°C (Minutos)</b>	<b>Valor Z (°C)</b>	<b>Método e Meio Utilizado</b>
Aragão (1989)	<i>Neosartorya Fischeri</i>	D <sub>80</sub> = 59,5 D <sub>85</sub> = 14,5 D <sub>90</sub> = 2,6 D <sub>93</sub> = 0,5	6,17	Frasco de três bocas (Meio = suco de morango com pH = 3,0 e 15 <sup>0</sup> Brix)
	<i>Byssochlamys nivea</i>	D <sub>80</sub> = 193,1 D <sub>85</sub> = 34,6 D <sub>90</sub> = 6,3 D <sub>93</sub> = 1,7	6,15	
	<i>Talaromyces flavus</i>	D <sub>75</sub> = 53,9 D <sub>80</sub> = 17,9 D <sub>85</sub> = 3,3 D <sub>90</sub> = 0,9	9,25	
	<i>Eupenicillium javanicum</i>	D <sub>80</sub> = 14,5 D <sub>85</sub> = 3,7 D <sub>90</sub> = 0,8	7,79	
Doyle & Marth (1975 a)	<i>Aspergillus flavus</i> A. <i>parasiticus</i> (conídios de 10 dias)	D <sub>55</sub> = 3,1 D <sub>55</sub> = 8,4	4,0 3,9	Frasco de três bocas (Meio = Solução tampão com pH = 7,0)
Doyle & Marth (1975 b)	<i>A.flavus</i> A.A. <i>parasiticus</i>	D <sub>55</sub> = 3,7 (pH = 4,5) D <sub>55</sub> = 17,7 (pH = 3,5)	*	Frasco de três bocas (Meio = Água tamponada com acetato de sódio e ácido acético)
Michener & King Jr. (1974)	<i>Byssochlamys fulva</i>	D <sub>86</sub> = 13	—	Tubo TDT (Tempo de morte térmica) e Frasco de três bocas (Meio = suco de uva)
Bayne & Michener (1979)	<i>Byssochlamys fulva</i> (1 mês)	D <sub>90</sub> = 1,2 a 46 (3log <sub>10</sub> )	—	Tubos TDT (Meio = solução de glicose 16°Brix + 0,033m de ácido tartárico, pH5,0)

<b>Autor</b>	<b>Fungo</b>	<b>Valor de D</b> T°C (Minutos)	<b>Valor Z</b> (°C)	<b>Método e Meio Utilizado</b>
King Jr. & Halbrook (1987)	<i>Ttalaromyces flavus</i> (1 mês)	D <sub>90</sub> = 2 a 8	10,3	Tubos TDT. (Meio = glucose, ácido tartárico, pH = 5,0)
Tournas & Traxler (1994)	<i>Nneosartorya fischeri</i> (3 meses)	D <sub>85</sub> = 20,6 D <sub>88</sub> = 12,6 D <sub>90</sub> = 4,7 D <sub>95</sub> = 2,8	9,1	Put & De jong (1982) (Meio = Água deionizada)
King Jr. & Whitehand (1990)	<i>Ttalaromyces flavus</i>	D <sub>85</sub> = 22 (meio líquido) D <sub>85</sub> = 39 (meio sólido)	—	Tubos TDT fechados com calor (Meio = solução de glicose 16°Brix + 0,033m de ácido tartárico, pH = 5,0)
Baglioni (1998)	<i>NNeosartorya fischeri</i> 1 mês de idade	D <sub>90</sub> = 6,14 D <sub>92</sub> = 4,72 D <sub>94</sub> = 2,62	10,8	Tubos TDT selados com aquecimento (meio = polpa de tomate, 8°Brix)
Baglioni (1998)	<i>NNeosartorya fischeri</i> 3 meses de idade	D <sub>90</sub> = 10,2 D <sub>92</sub> = 6,31 D <sub>94</sub> = 4,54	11,6	Tubos TDT selados com aquecimento (meio = polpa de tomate, 8°Brix)
Splittstoesser et al. (1993)	<i>NNeosartorya aureola</i> <i>N. fischeri</i> var. <i>glabra</i> <i>N. pseudofischeri</i>	D <sub>85</sub> = 10 D <sub>85</sub> = 12 D <sub>85</sub> = 12	—	Tubos capilares fechados com aquecimento (Meio = suco de uva 4,5°Brix)
Gumerato (1995)	<i>NNeosartorya fischeri</i> (1 mês de idade)	D <sub>85</sub> = 15,11 D <sub>88</sub> = 4,70 D <sub>90</sub> = 2,63 D <sub>95</sub> = 0,43	5,28	Tubos TDT fechados com tampão de algodão (Meio = suco de maçã 15,5°Brix e pH = 3,0)
Nielsen & Samsom (1992)	<i>NNeosartorya aureola</i> <i>N. pseudofischeri</i> <i>N. fischeri</i> var. <i>fischeri</i>	D <sub>85</sub> = 10 D <sub>85</sub> = 25 D <sub>85</sub> = 2	12,0 7,0 9,0	Tubos com tampa rosqueável colocados em banho com agitação (Meio = suco de maçã)

\* = Valores de Z (°C) não foram apresentados no trabalho.

Fonte: DELGADO, Ap. Denise. Ação esporocida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados em laminado para embalagens assépticas. Campinas, 2001.



### 3.5 Fatores que aumentam a Termo-Resistência

#### 3.5.1 Temperatura de crescimento

KING JR. & WHITEHAND (1990) trabalhando com o fungo *T. flavus* nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C, observaram que houve uma produção abundante de ascósporos nas temperaturas de 25, 30 e 35°C e limitada a 20°C, concluindo que a temperatura na qual o fungo cresce é muito importante para sua resistência térmica.

De acordo com BEUCHAT & RICE (1979), as temperaturas de incubação entre 28 e 35°C são ótimas para crescimento e produção de ascósporos de *Byssoschlamys*, mas existe isolado que, se forem incubados abaixo de 30°C em um meio sintético, perdem irreversivelmente a capacidade de formar ascos. PITT & HOCKING (1985) sugerem que é necessária a incubação de culturas de *Byssoschlamys* a 30°C em laboratório para a observação de ascos e ascósporos, já que alguns isolados não produzem ascos a 25 e 37°C. ENGEL & TEUBER (1991) testaram a influência da temperatura de incubação na produção de ascósporos de *B. nivea* em Ágar Extrato de Malte (MEA), por 21 dias. Encontraram que, nas temperaturas 20 e 37°C, a produção de ascósporos foi bem menor em relação à produção em 25 e 30°C, obtendo-se em 30°C o maior número de ascósporos.

#### 3.5.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)

É bastante ampla a faixa de pH em que os fungos termoresistentes podem crescer em um dado meio. *Neosartorya fischeri* cresce em pHs entre 3,0 e 7,95 e o *Byssochlamys spp* cresce em substrato nutrientes com pH entre 2,0 e 9,0, estando por volta de pH 3,0 o ideal (TOURNAS, 1994). Como podemos observar, a faixa é bem ampla, tornando inviável inibir o crescimento destes fungos em alimentos pela correção do pH.

SPLITTSTOESSER et al. (1969) observaram que o pH afetava a produção de ascósporos de *B. fulva*, obtendo a máxima produção de ascósporos no meio de caldo de extrato de malte, na faixa de pH de 2 - 3.

SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977) trabalhando com ascósporos de *B. fulva* e *A. fischeri*, observaram que o *B. fulva* apresentou resistência máxima ao tratamento de 85°C por 60 minutos entre pH 3,0 e 4,0, porém em pH maior, mostraram-se mais sensíveis ao tratamento térmico. Enquanto para ascósporos de *A. fischeri*, foi observada uma quantidade significativa de sobreviventes entre pH 3,0 e 5,5.

### **3.5.3 Idade do esporo**

Segundo DOYLE & MARTH (1975a), citado por DELGADO (2001), trabalhando com conídios de *A. flavus* e *A. parasiticus* que foram testados nas temperaturas de 40, 50, 55 e 60°C utilizando calor úmido em várias idades do esporo, observaram que conídios mais velhos eram menos resistentes ao calor úmido, do que os mais jovens isto quando tratados a 55°C por aproximadamente 45 minutos.

CONNER & BEUCHAT (1987a) observaram que ascósporos de *N. fischeri* var. *glaber* (FRR 1833) de 21 dias de idade eram mais termo-resistentes que os de 8 dias. Também observaram que os ascósporos cultivados em temperaturas menores (18 e 21°C) tendiam a ser menos resistentes ao calor do que ascósporos cultivados a 25 e 30°C, embora sendo da mesma idade, concluindo que os ascósporos formados em temperaturas menores são fisiologicamente mais jovens do que os formados em temperaturas maiores.

A influência da idade dos ascósporos foi também estudada por CASELLA et al (1990) que observaram que os ascósporos mais velhos (16 semanas) de *B. nivea* eram mais resistentes ao tratamento térmico do que os mais jovens (8 semanas), quando os esporos eram obtidos a partir de um meio muito nutritivo como o MEA (extrato de malte e Agar), nas temperaturas de 25 e 35°C. O mesmo não aconteceu quando o meio utilizado foi o PDA (água batata dextrose), que é menos nutritivo (ocorrendo este fato com a incubação a 35°C e não a 25°C).

TOURNAS & TRAXLER (1994), citado por DELGADO (2001), trabalharam com ascósporos de *N. fischeri* de 1, 2, 3 e 6 meses de idade, isolados de suco concentrado de abacaxi, que foram aquecidos a 88°C por 1 hora em água deionizada. Observaram que os ascósporos mais velhos eram mais resistentes do que os mais jovens, a essa temperatura.

NIELSEN & NIELSEN (1995) investigaram a resistência de ascósporos e conídios (encontrados em pães e queijos) de várias idades frente ao etanol 70%. Os fungos foram incubados de 17 a 110 dias. Observaram que a resistência dos ascósporos de *Eurotium repens*, *Monascus ruber* e *Neosartorya pseudofischeri* foi aumentada significativamente pela idade, porém, não sendo observado o mesmo para conídios de alguns fungos. Concluíram que, o aumento de resistência dos

ascósporos com maior idade pode ser consequência de alterações estruturais e/ou bioquímicas ocorridas no esporo com o tempo.

#### **3.5.4 Ácidos Graxos**

BANNER et al (1979) determinaram e compararam a composição química de ascósporos de duas linhagens de *B. fulva* com resistências térmicas diferentes. Encontraram que a linhagem mais termoresistente apresentava uma quantidade superior de ácidos graxos com mais de 20 carbonos. Foi sugerido que a presença de ácidos graxos de cadeia longa nos ascósporos de *Byssoschlamys* pode explicar em parte sua alta resistência, uma vez que estes ácidos graxos não foram anteriormente detectados em esporos de fungos comuns.

#### **3.5.5 Ácidos Orgânicos**

A tolerância de ascósporos de fungos termo-resistentes aos ácidos orgânicos durante a exposição à altas temperaturas depende do tipo de ácido, da concentração da forma não dissociada deste e do pH do meio de aquecimento.

SPLITTSTOESSER et al (1974), citado por BAGLIONE (1998), aqueceram ascósporos de *B. fulva* em diferentes soluções de ácidos orgânicos (0,05M, pH 3,0) e água destilada (controle) à 85°C durante 120 minutos. Os resultados mostraram que os ácidos málico, tartárico e cítrico protegem os ascósporos (maior resistência), ao contrário dos ácidos fumárico, láctico e acético,

que exercem efeito de sensibilização ao calor (menor resistência). SPLITSTOESSER & SPLITSTOESSER (1977) observaram ainda que em *Aspergillus* a adição de ácidos orgânicos não tem efeito sobre a termo-resistência dos esporos deste fungo.

CONNER & BEUCHAT (1987a) estudando três linhagens de *N. fischeri* em suco de maçã, uva e tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) verificaram um aumento da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* com adição no meio de aquecimento de ácido fumárico, seguido do ácido cítrico, málico e tartárico, entretanto, KING JR. & WHITEHAND (1990) não observaram maior ou menor termo-resistência de *T. flavus* em relação a diferentes tipos de ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico, láctico ou tartárico) presentes no meio de aquecimento (pH 5,0 e solução glucose 16° Brix).

### **3.5.6 Altas concentrações de solutos no meio**

Segundo BAGLIONI (1998), uma maior quantidade de sólidos solúveis (açúcares, etc) no meio de aquecimento pode exercer um efeito protetor sobre ascósporos de fungos termo-resistentes.

DOYLE & MARTH (1975a,b) mostraram que a resistência ao calor de conidiosporos de *A. flavus* e *A. parasiticus* aumentou em soluções que continham sacarose, glicose e cloreto de sódio. SPLITSTOESSER & SPLITSTOESSER (1977) observaram que, com a elevação da concentração da solução de glicose, houve aumento no número de sobreviventes para o *B. fulva* após o tratamento térmico de 75 minutos a 85°C e *Aspergillus* WR1 após 60 minutos a 85°C. Concluíram que a glicose possuía um efeito protetor.

SPLITTSTOESSER (1978) citado por TOURNAS (1994) estudaram o efeito de açúcares na resistência ao calor de ascósporos de *B. fulva* e *A. fischeri*. Observou ainda que quando os esporos eram aquecidos em soluções de glicose, havia um número maior de sobreviventes.

CONNER E BEUCHAT (1987a) observaram que a resistência de ascósporos de três linhagens de *N. fischeri* em temperaturas elevadas aumentava, em soluções contendo maiores concentrações de sacarídeos. Utilizaram o meio suco de maçã (12,3°Brix), uva (16,6°Brix) e tampão fosfato e observaram que as linhagens sobreviveram ao tratamento de 95°C por 30 minutos em suco de maçã e não nos outros meios. Isto sugere que os açúcares, glicose, sacarose e frutose, em associação com os ácidos orgânicos ou pH do suco de maçã, protegeram os ascósporos.

TOURNAS & TRAXLER (1994) observaram que os ascósporos de *N. fischeri* aquecidos a 85, 88, 90, 95 e 100°C por 1 hora, em suco de abacaxi concentrado (42,7 Brix), eram mais termo-resistentes do que quando aquecidos em água deionizada estéril e suco de abacaxi (12,6°Brix) sendo esse efeito protetor muito perceptível, provavelmente devido à maior porcentagem de sólidos solúveis.

### **3.6 Ativação Térmica**

SPLITTSTOESSER et al. (1972) verificaram que a ativação de ascósporos de *B. fulva* era influenciada pela temperatura e pelo meio no qual eles estavam. Observaram que a 60°C por 120 minutos o número de esporos ativados era maior em pH 1,0. Quando houve um aumento de 0,4 unidades (de pH 1,0 para

1,4), houve quase 90% de diminuição no número de esporos ativados. Os esporos ativados, estocados em suspensão aquosa a 32°C por algum tempo, foram plaqueados e observaram que 50% dos esporos voltaram ao estado de dormência.

Estudando ascósporos de *Aspergillus (Neosartorya)*, SPLITTSTOESSER & SPLITTSTOESSER (1977), citado por ARAGÃO (1989), observaram que os ascósporos de *Byssochlamys* apresentavam baixa porcentagem de germinação e produção de colônias, a menos que fossem ativados pelo calor, e que praticamente 99% dos ascósporos encontravam-se dormentes antes da ativação. No caso dos *Aspergillus*, também foi importante a escolha do meio de cultura utilizada para suspensão de esporos, observando-se melhor ativação térmica em suco de tomate e uva do que água.

A necessidade de ativação para o *T. flavus* foi confirmada por KING & HALBROOK (1987), embora os tratamentos indicados sejam diferentes dos demais, variando de 12 a 15 minutos a 80°C; 6 a 8 minutos a 85°C e 1 a 2 minutos a 90°C.

CONNER & BEUCHAT (1987) estudando a resistência térmica de linhagens de *N. fischeri*, em suco de maçã 12,3°Brix, pH 3,8, observaram que aquecendo o suco a 84°C durante 30 e 60 minutos, ativavam os ascósporos aumentando em 10 vezes a população inicial, comparando-se com os ascósporos não aquecidos.

ARAGÃO (1989) construiu curvas de ativação térmica pelo método TDT, desenvolvida por BIGELOW & ESTY (1920) e citado por STUMBO (1973), usando o suco de morango como meio de aquecimento. Concluiu que o tratamento ótimo para ativação térmica dos fungos *B. nivea* e o *T. flavus* era de 5 minutos a 80°C. Para *N. fischeri*, os tratamentos foram de 10 minutos a 80°C e para *Eupenicillium javanicum* 5 minutos a 70°C.

### 3.7 Pressão

Segundo BAGLIONI (1998), emprego de pressões hidrostáticas elevadas (500 - 10000 bar) em alimentos para destruir microrganismos deteriorantes e inativar enzimas, vem sendo estudado e utilizado recentemente. BUTZ et al. (1996); ROSENTHAL & SILVA (1997), concluíram que a transmissão da pressão ocorre de forma isostática, ou seja, instantânea e uniformemente por todo alimento, sendo possível a preservação de nutrientes e compostos responsáveis pelo aroma e sabor.

MAGGI et al. (1994) observaram que os ascósporos de *B. nivea*, *B. fulva* e *N. fischeri* foram os mais resistentes quando submetidos a tratamentos com altas pressões (6000, 7000, 8000 e 9000 bars) a 20°C, com pré-aquecimento do produto a 50 e 60°C. Foi utilizado néctar de damasco e água destilada. Concluíram que os ascósporos de *T. flavus* apresentaram baixa resistência nas condições estudadas, porém, os ascósporos de *B. nivea*, que se mostraram os mais resistentes, foram completamente inativados na pressão de 8000 bars em 3 minutos com um pré-aquecimento de 50°C.

BUTZ et al. (1996) investigaram a resposta de algumas espécies de fungos termo-resistentes (*B. nivea*, *B. fulva*, *Eurotium* spp, *Eupenicillium* spp e *Paecilomyces* spp) frente a um tratamento combinado alta-pressão – temperatura. As formas vegetativas (conídios/hifas) foram destruídas pelo tratamento mais brando (300 MPa / 25°C). Os ascósporos de *B. nivea* se mostraram mais resistentes à pressão, sendo necessárias pressões acima de 600 MPa para inativação, ao contrário do que ocorreu para as outras espécies testadas que foram destruídas com tratamentos mais brandos. Observou, com auxílio da microscopia eletrônica que a



alta pressão rompe ascos e danifica parede dos ascósporos (*B.nivea*, tratamento de 700 MPa / 70°C, tempo suficiente para inativação total dos ascósporos).

### 3.8 Outras Considerações de Fungos Filamentosos

Em relação à metodologia de quantificação de fungos termo-resistentes, HOCKING & PITT (1984), citados por SAMSON et al. (1992), no experimento a 80°C por 30 min, observaram a necessidade de um tempo maior que 7 dias para a enumeração e identificação de fungos termo-resistentes. Segundo os autores, este tempo permite que os ascósporos debilitados ou injuriados pelo calor tenham um tempo adicional para a formação de colônias. SAMSON et al. (1992) trabalharam com polpa de framboesa e concluíram que a quantidade de amostra (100g ou 10ml) é importante para a enumeração de fungos termo-resistentes.

ARAGÃO (1989) estudou a ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em 15 amostras de polpa de morango sendo que o gênero mais prevalente foi o *Eupenicillium* spp e em segundo *Talaromyces* spp além de *B. nivea* e *N. fischeri* com menor ocorrência.

BAGLIONI (1998) observou que a ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes durante o processamento asséptico de polpa de tomate é baixo, sendo as maiores contagens obtidas na matéria prima, na água de pré-lavagem e transporte. Das 50 espécies de fungos isolados, o mais termo-resistente foi o *N. fischeri*, com sobrevivência ao choque de 100°C por 25 minutos em polpa de tomate. Com isso, concluiu a possibilidade deste fungo resistir ao tratamento térmico de esterilização aplicado para polpa de tomate na indústria.

JESENSKA et al. (1991) sugeriram ainda um melhor entendimento da ecologia dos fungos termo-resistentes, devido a perdas consideráveis causadas pela presença destes fungos na indústria. Concluíram que o solo contém grandes quantidades do fungo *N. fischeri*, por isso os equipamentos das plantas de processamento devem ser protegidos do solo e pó, assim como a matéria prima.

GIRARDI & LATGÈ (1986) utilizaram padrões de proteínas e antígenos para diferenciar entre três variedades de *N. fischeri* e separá-los do grupo do fungo *A. fumigatus*. Utilizaram técnicas como eletroforese em gel realizada a partir de extratos de micélio dos dois fungos. As propriedades antigênicas foram estudadas com o teste ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assav) e o teste de Imunoblotes.

Além de apresentar alta resistência à temperatura, os fungos termo-resistentes têm apresentado resistência a baixas atividade de água ( $a_w$ ), como foi observado por BEUCHAT (1992) que trabalhou com vários tipos de frutas em pó e observou que os ascósporos dos fungos *N. fischeri* e *T. flavus* podem manter a viabilidade em  $a_w$  de 0,23 e 25°C, em períodos longos de estocagem (30 meses), sendo um período maior do que o normalmente utilizado na prática comercial.

Analisando a atividade esporicida do peróxido de hidrogênio sobre fungos isolados de laminado utilizado para a confecção de embalagens Tetra BriK®, DELGADO (2001) concluiu que *N. fischeri* pode sobreviver ao tratamento atualmente utilizado para a esterilização destas embalagens.

### **3.9 Produção de Metabólitos**

### 3.9.1 Produção de Enzimas

Segundo BEUCHAT & RICE (1979); TOURNAS (1994), citado por BAGLIONI (1998), os fungos termo-resistentes excretam vários tipos de enzimas, estando entre elas as enzimas pectinolíticas e amilolíticas, relacionadas com o efeito de desintegração progressiva produzidas em frutos deteriorados por estes microrganismos.

OLLIVER & RENDLE (1934) fizeram a primeira demonstração da produção de enzimas pectinolíticas por *Byssoschlamys* spp, embora, mais tarde verificou-se a produção de outros tipos de enzimas pectinolíticas por este fungo e que produção variava de acordo com o substrato utilizado.

HANG & WOODAMS (1993) descreveram que o *B. fulva* e *T. flavus* produzem a enzima glucoamilase. *T. flavus* excretou glucoamilase que exibiu atividade máxima à 50°C na faixa de pH de 4,0 a 4,8 já o produzido por *B. fulva*, exibiu atividade máxima na mesma temperatura (50°C) e faixa de pH de 4,0 a 5,2. Sugeriram ainda, que a glucoamilase produzida por *T. flavus* poderia ter valor comercial na conversão da suspensão de amido em xaropes com alto teor de glucose a temperaturas elevadas evitando, assim, o risco de contaminação microbiana.

KOTZEKIDOU (1997), citado por BAGLIONI (1998), estudando a produção de enzimas pectinolíticas por uma linhagem de *B. fulva* em meios fermentativos definidos, detectou apenas atividade da enzima polygalacturonase, indicando uma possível aplicação em casos onde apenas um tipo de enzima pectinolítica é necessária.

### 3.9.2 Produção de Micotoxinas

Segundo BAGLIONI (1998), além de provocarem alterações em alimentos, os fungos termo-resistentes podem produzir diferentes metabólitos secundários tóxicos, entre os quais estão a patulina, o ácido bissoclâmico, byssotoxina A, assimetrina e variotina (*B. fulva* / *B. nivea*); terreina, verruculogena, fumitremorginas A, B, C, fischerina (*N. fischeri*). Testes com animais de laboratório demonstraram que todas são altamente tóxicas e algumas vezes carcinogênicas.

Além dos problemas enzimáticos, existe ainda a possibilidade de produção de micotoxinas por algumas linhagens de *Byssoschlamys*, o que implica em riscos à saúde pública. Dentre estes metabólitos tóxicos destacam-se a patulina, o ácido bissoclâmico e a bissotoxina A.

Segundo SCUSSEL (1998), a patulina é denominada como 4-hidroxi-4H-furo [3,2-c] pirano2(6H)-1. Sua fórmula molecular é  $C_7H_6O_4$  e seu peso molecular é de 154,12 g/mol. Sua atividade carcinogênica é atribuída à insaturação  $\alpha,\beta$ , junto com uma dupla ligação conjugada externa, unida na posição 4 do anel lactona. Sua absorção UV máxima é de 256.5nm e apresenta solubilidade em água e solventes orgânicos comuns, exceto éter de petróleo. É instável em solução alcalina, reduzindo sua atividade biológica.

A patulina, também chamada clavicina, claviformina ou expansina é produzida pelo *Penicillium expansum*, *Aspergillus clavatus* e *Byssoschlamys nivea*. É encontrada contaminando maçã, pêra, cidra e seus sucos, além de pão embolorado e silagem. Normalmente é encontrada em altas concentrações não na parte expoliada da fruta, mas na sua parte normal (não afetada).

Possui efeito antibiótico, porém, devido ao seu efeito tóxico, não é utilizada com este fim. Seu efeito tóxico é caracterizado por distúrbios respiratório e motor, além de apresentar espasmos, asfixia, hemorragia no pulmão e cérebro. Além disso, tem ação teratogênica. A dose letal para ratos é 10-15 mg/kg.

A patulina é considerada um perigo para a saúde do ser humano, devido a formação de câncer de esôfago em pacientes que ingeriram suco de maçã e cidra contaminados pela toxina. Foi observado elevada incidência desta toxina em sucos na França, Alemanha, Japão e Estados Unidos.

A contaminação de sucos de maçã por Patulina acontece, principalmente, em períodos de baixa produção, quando a matéria prima é escassa. Para manter a produção, maçãs de baixa qualidade, mesmo apresentando manchas, podridão e outros tipos de deterioração são utilizados juntamente com maçãs sadias na produção do suco.

KING et al. (1972) estudou o ácido bissoclâmico, concluindo que se trata de um metabólito altamente tóxico para ratos. Para o homem, determinaram que, com grande margem de segurança, poderia ingerir, sem problemas. Até 50 litros de suco contaminado por dia, considerado de apenas as conseqüências da presença da micotoxina. Observaram ainda que não havia produção de ácido bissoclâmico em latas seladas, considerando pequena a possibilidade de sua ocorrência em latas contaminadas por *B. fulva*.

VALLETRISCO et al. (1982) destacam vários trabalhos de pesquisa da ocorrência de patulina em maçãs e sucos de maçã, onde foi detectada, algumas vezes em quantidades elevadas, embora o produto estivesse, aparentemente, em bom estado de conservação.

RICE (1980) demonstrou que os conteúdos de oxigênio no “headspace” em alguns sucos comercializados, como o de uva em embalagens de vidro foi de 0,16 0,58 % de oxigênio. Com este percentual, é possível inferir que o *N. fischeri* pode crescer e produzir fumitremorginas em alguns produtos a base de frutas, especialmente aqueles acondicionados em embalagens que não são fechadas hermeticamente.

Linhagens de *N. fischeri* são capazes de produzir micotoxinas como terreína, fumitremorginas A, B, C e verruculogena. Estes metabólitos (fumitremorginas), agem no sistema central causando tremores, convulsões e morte em animais de laboratório, sendo a verruculogena o composto considerado de maior toxicidade. (NIELSEN et al. 1988; TOURNAS 1994).

NIELSEN et al (1989a), citado por BAGLIONI (1998) investigaram o efeito simultâneo do pH (2,5, 3,5 e 4,5) e presença de ácidos orgânicos normalmente presente em frutas (ácidos tartárico, málico e cítrico) em diferentes concentrações (em meio CYA, 25°C) sobre a produção de fumitrmorginas A e C e verruculogena por *N. fischeri*. Concluíram que todas as variáveis apresentadas possuem influência sobre a quantidade de micotoxinas produzidas. Em pH 2,5, a síntese de micotoxinas foi promovida pelos três ácidos testados. NIELSEN et al. (1989b) verificou a formação de micotoxinas por *N. fischeri* (CYA, 25°C) em atmosferas com diferentes tensões de oxigênio. Foi constatada uma produção de fumitremorginas A e C e verruculogena em atmosferas contendo 3,0% e 20,9% de oxigênio (ar). Entretanto esta produção foi significativamente reduzida nas tensões mais baixas de oxigênio (1,0% e 0,10%).

### 3.10 Espécies de Fungos Termo-resistentes

#### 3.10.1 Gênero *Byssochlamys*: *Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea*

Os fungos do gênero *Byssochlamys* (sub reino Ascomicotina) são caracterizados pela ausência de cleistotécio, gimnotécio ou qualquer outro corpo que envolva os ascos durante o desenvolvimento. Os ascos em *Byssochlamys* são produzidos em cachos irregulares abertos, contendo geralmente oito ascósporos em associação (mas não envolvidos) por fragmentos de hifas brancas. (BAGLIONI, 1998).

Segundo avaliação macroscópica realizada por ARAGÃO (1989), o *B. nivea*, em B.D.A., apresenta cor branco-gelo, reverso bege a ligeiramente amarelo, com bordas finas e de aspecto aracnóide durante o período de crescimento, tornando-se esbranquiçada e de aspecto granular, quando há predominância de ascos. Microscopicamente, apresenta ascos arranjados de forma irregular, em pequenos grupos, contendo oito ascósporos, sendo sua principal característica a presença de ascos nus.

OLLIVER & SMITH (1933), identificaram *B. fulva* a partir de produtos de frutas engarrafadas e enlatadas. Ele foi primeiro fungo filamentoso termo-resistente reconhecido como causador da deterioração em produtos de frutas.

PUT (1964) considerou que o *B. fulva* era mais resistente e de ocorrência mais freqüente que *B. nivea*, entretanto, demonstrou que os ascósporos de *B. nivea* tinha praticamente a mesma resistência térmica que os de *B. fulva*, estando, em alguns casos, presentes em maior número, comprovando sua grande resistência.

O *Byssochlamys nivea* geralmente forma colônias brancas em Agar Extrato de Malte (MEA) ou Agar Czapeck Extrato de Levedura (CYA). É capaz de produzir clamidósporos; seus ascos e ascósporos são de dimensões menores que os de *B. fulva*. Por sua vez, *Byssochlamys fulva* produz colônias marrons amareladas nestes meios e não produz clamidósporos. (BAGLIONI, 1998).

OLLIVER & RENDLE (1934); PUT & KRUISWIJK (1964); MAUNDER (1969); CARTWRIGHT & HOCKING (1984), relataram vários casos de contaminação por estes fungos tanto em polpa quanto em calda de frutas processadas. OLLIVER & RENDLE (1934), detectaram *B. fulva* em morango cozido e ainda em outras frutas processadas como ameixas, framboesa, maçã, laranja e groselha.

SWANSON et al (1985); VAN DER RIET & VAN DER WALT (1985) apresentaram estudos da deterioração da maçã provocada pelo *Byssochlamys* spp.

Outros relatos foram feitos, como os de MAUNDER (1969) que isolou *Byssochlamys* de amora e abacaxi. DRAGONI & COMI (1985) isolaram este fungo em pêssego e damasco. CARTWRIGHT & HOCKING (1984) de maracujá e ARAGÃO (1989), isolou *Byssochlamys* da polpa de morango.

Além de frutas e sucos de frutas, espécies de *Byssochlamys* já foram isoladas de outros produtos como pudim de fruta. MAUNDER (1969) isolou *Paecilomyces* sp. de recheio de torta de tâmara e YATES & FERGUSDN (1963) isolaram o fungo *B. nivea* de salmoura de pepino enlatado. SPOTTI et al (1992), realizaram estudos em produtos semiprocessados de frutas e sucos de frutas comerciais, onde foi detectado *Byssochlamys nivea* a níveis superiores a 3 esporos/Kg.



EIROA & AMSTALDEN (1985) isolaram maior número de *B. fulva* do que de *B. nivea* em amostras de folhas, frutos e solo de hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas, S.P, sendo a maior parte das amostras contaminadas encontradas em solo de cultivo de morango (50% estava contaminada com *Byssoschlamys* spp., sendo 60% com *B. fulva* e 40% com *B. nivea*). *Byssoschlamys* foi ainda isolado de 40% das amostras de pomar de pessegueiros, de 10% das amostras de pomar de laranjeiras, e de 10% de amostras de vinhedos e hortas de pepino.

Segundo SPLITTSTOESSER (1991), citado por BAGLIONI (1998), os ingredientes de produtos de fruta que tiveram contato com o solo também podem apresentar uma contaminação significativa com esporos de fungos termoresistentes. Como exemplo, pode ser citada a farinha de mandioca que pode ser usada como espessante em pudins de fruta e recheios de torta, freqüentemente contém ascósporos de *Byssoschlamys*.

Quanto à resistência térmica, OLLIVER & SMITH (1933) observaram que os esporos de *B. fulva* podem sobreviver por 30 minutos a 87 - 88°C, o que, segundo estes autores explica a sua sobrevivência em produtos pasteurizados.

Segundo MAUNDER (1969), citado por ARAGÃO (1989), observou que o meio de suspensão para aquecimento dos esporos interfere na resistência térmica de *B. fulva*, sendo que o tempo para destruição de  $10^3$  ascos/mL, a 90°C, variava de 5 minutos, em suco de fruta, a 15 minutos, em pudim de fruta, para a mesma linhagem.

BEUCHAT & TOLEDO (1977) citado por ARAGÃO (1989), observaram a resistência térmica dos ascósporos de *Byssoschlamys* afetada pelo efeito de proteção de altas concentrações de sacarose. Adicionando várias concentrações de sacarose

(0 a 60 g/100mL) ao suco de uva previamente inoculado com suspensão com  $10^5$  ascósporo/mL de *B. nivea*, observaram que, após sete horas de aquecimento a 75°C, nenhum ascósporo viável foi detectado em suco sem adição de açúcar, e para o suco com 60g de sacarose/100ml, entretanto, o número de ascósporos foi reduzido em apenas 70%, após aquecimento a 75°C por oito horas. Concluíram que a diferença de pressão osmótica entre o meio de suspensão e os ascósporos poderia favorecer sua resistência à inativação.

Também foram estudadas as influências da temperatura na resistência térmica de ascósporos de *Byssoschlamys nivea*. Segundo ENGEL & TEUBER (1991), observaram maior resistência em ascósporos produzidos a 30°C, em ágar extrato de malte por 21 dias, do que os produzidos nas temperaturas de 20, 25 e 37°C. Já OLLIVER & RENDLE (1934), em concordância com ROLAND et al. (1984) E ROLAND & BEUCHAT (1984), observaram que a temperatura ótima para o crescimento do *Byssoschlamys* estava entre 30 e 37°C.

Vários tratamentos térmicos para ativação de *Byssoschlamys* spp. encontram-se citados na literatura:

KING et al. (1969) definiu o aquecimento por 4 minutos a 80°C

KING et al. (1979) definiu 20 minutos a 80°C.

HATCHER et al. (1979) definiu 15 minutos a 80°C.

PUT & KRUISWIJK (1964) definiu para *B. fulva*, 70°C por 10 minutos.

BEUCHAT & TOLEDO (1977) definiu para o *B.nívea*, 70°C por 1 hora

ARAGÃO (1989) definiu para o *B. nívea*, 80°C por 5 minutos.

### 3.10.2 Gênero *Talaromyces*: *Talaromyces flavus*

O gênero *Talaromyces* (sub reino Ascomicotina) é caracterizado pela produção de gimnotécios brancos ou amarelos em associação com o estado anamórfico característico de *Penicillium*, *Paecilomyces* ou *Geosmithia*. *Gimnotécio* é o ascocarpo (onde os ascos são produzidos), composto por hifas finas entrelaçadas resultando em uma estrutura mais ou menos fechada de tamanho indeterminado. A espécie mais comumente isolada de alimentos ácidos termoprocessados é o *Talaromyces flavus*. (PITT & HOCKING 1985; SPLITTSTOESSER 1991, citados por BAGLIONI 1998).

Segundo avaliação macroscópica realizada por ARAGÃO (1989), a colônia de *T. flavus*, em M.E.A., apresenta coloração amarela, com reverso, primeiramente de coloração laranja, variando até marrom com a idade. Microscopicamente, apresenta ascocarpos amarelos, globosos, ascos sub-globosos, evanescentes, com oito ascósporos elipsoidais, amarelos com paredes grossas e espinosas.

Fazendo uma estimativa da distribuição do *T. flavus* nos Estados Unidos e outros países, FRAVEL & ADAMS (1986) concluíram que este fungo tem uma distribuição mundial, sendo isolado em solos de 22 estados norte-americanos, dos 33 estudados, e em mais 16 países, onde foi feita a investigação. Também relataram o fato de *T. flavus* ser usado como antagonista de espécies de *Verticillium* em plantações de batata.

Foi isolado em suco de maçã por VAN DER SPUIY et al (1975); em tomate in natura por SPOTTI et al (1992); em polpa de morango por ARAGÃO (1989) e em suco de abacaxi por ENIGL et al (1993).

Referente a resistência térmica, KATAN (1985) observou uma rápida destruição de 9 linhagens de *T.flavus*, com inativação de  $10^6$  ascósporos em 20 minutos de aquecimento a 80°C.

BEUCHAT (1986), citado ARAGÃO (1989), avaliando a resistência térmica dos fungos *T. flavus*, *Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys*. sp em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0 e em vários produtos de frutas, observou que, de três linhagens de *T.flavus* testadas, duas foram mais resistentes que os demais fungos. O mesmo foi observado por SCOTT & BERNARD (1987), trabalhando com suco de maçã. Obtiveram para o *T. flavus* um D igual a 200 minutos a 80°C, enquanto que para o *N. fischeri* um D aproximadamente 4,6 minutos a 85°C.

Referente a ativação dos ascósporos, KATAN (1985), citado por BAGLIONI (1998), expôs diferentes linhagens de *T. flavus* às temperaturas de 50, 53, 70 e 80°C em diferentes tempos no meio caldo batata dextrose. Observou que à 53°C com tempo variando entre 15 minutos e 6 horas e 70°C entre 30 minutos e 1 hora de exposição, obteve-se uma boa recuperação de ascósporos. Nas outras temperaturas, observou que à 50°C precisaria no mínimo de 3 horas para haver a ativação e a 80°C, nos tempos de 20 e 30 minutos, os ascósporos foram destruídos.

Avaliando os fatores que afetam a resistência deste fungo, KING Jr. & WHITEHAND (1990), testando a resistência térmica dos ascósporos de *T. flavus* em ácidos cítrico, málico ou tartárico (0,033M) em meio de aquecimento definido (solução glucose 16° BRIX, pH 5,0), concluíram que as diferenças não foram significativas de ação sobre a inativação térmica, para cada ácido. Neste mesmo

trabalho, constataram um aumento na resistência térmica de ascósporos do *T. flavus* à medida que se elevava a quantidade de açúcar em meio sintético.

BEUCHAT (1992), citado por DELGADO (2001), trabalhando com vários tipos de frutas em pó, observou que os ascósporos dos fungos *T. flavus* e *N. fischeri* podem manter a viabilidade em atividade de água ( $a_w$ ) de 0,23 e 25°C, em períodos longos de estocagem (30 meses), período este maior do que o normalmente utilizado na prática comercial.

### **3.11 Cinética da Inativação Térmica (Método de Linearização de Alderton & Snell, 1970)**

A maior parte dos microrganismos apresenta uma taxa de inativação térmica logarítmica, ou seja, é obtida uma linha reta quando se constrói a curva de morte plotando-se o logaritmo do número de sobreviventes versus tempo de aquecimento a uma dada temperatura (KING JR. et al. 1979). Colocando-se em gráfico os valores encontrados para os fungos termoresistentes, percebe-se que a curva de inativação térmica não é logarítmica, apresentando um “ombro” no início, seguido de uma taxa de morte acelerada (parte logarítmica da curva). À medida que a temperatura de inativação aumenta, a fase “lag” ou “ombro” vai diminuindo, ficando a curva semelhante a uma reta (KING, JR. et al. 1979. BAYNE & MICHENER, 1979, KING & HALBROOK, 1987; KOTZEKIDOU, 1997, BAGLIONI, 1998).

Segundo BAGLIONI (1998), a medida da resistência térmica de microorganismos (células ou esporos) que seguem uma taxa de morte logarítmica é

feita pela determinação dos parâmetros “D” (tempo requerido a uma dada temperatura para destruir 90% da população de microorganismos em um meio de aquecimento definido) e “Z” (graus de temperatura requeridos para ocasionar uma variação de 10 vezes no valor de D).

Um dos métodos utilizados para linearização da curva não logarítmica de sobrevivência do método de ALDERTON & SNELL (1970).

Para linearização da curva de sobreviventes pelo método de ALDERTON & SNELL (1970) utiliza-se a seguinte equação:

$$(\log N_0 - \log N)^a = kt + C \quad (\text{equação 1})$$

onde:

$N_0$  = Concentração inicial de ascósporos/mL

$N$  = Concentração de sobreviventes/ mL (após um tratamento térmico de  $t$  minutos)

$a$  = parâmetro para linearização (expoente)

$K$  = Constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada)  
( $\text{min}^{-1}$ )

$C$  = Coeficiente linear da curva linearizada

$t$  = (min)

O valor de “a” é o inverso do coeficiente angular da curva  $\log (\log N_0 - \log N)$  versus  $\log t$ , sendo calculado para o menor tratamento térmico e pode ser aplicado na linearização das demais curvas. Se a taxa de morte segue a equação 1

e se não ocorrerem erros experimentais, “C” seria zero. Sendo assim o valor de “l/K” é derivado da equação 2:

$$1/K = t/ (\log N_0 - \log N )^a \quad (\text{equação 2})$$

A equação 2 é similar à equação da curva logarítmica, quando  $a= 1$

$$D= t/ (\log N_0- \log N) \quad (\text{equação 3})$$

Segundo BAGLIONI (1998), por analogia das equações 2 e 3. “l/k” é um parâmetro equivalente a “D”.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Matéria prima e Amostragem

Para o experimento foi utilizada maçã do tipo fugi. A maçã foi desintegrada e homogeneizada em triturador e a polpa obtida diluída em água destilada. A seguir adicionado açúcar invertido até o suco atingir 12° Brix e solução de ácido cítrico para o ajuste do pH 3,2 (em anexo). Após, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

### 4.2 Seleção das Culturas

Para o estudo da resistência térmica foi escolhida uma cepa de gênero de fungos filamentosos perfeitos isolados anteriormente em polpa de morango (ARAGÃO, 1989). As espécies selecionadas para avaliação da resistência térmica, neste estudo, foram do tipo *Byssoschlamys nivea* e *Talaromyces flavus*.

Estes fungos apresentam estruturas (ascos e ascósporos) que lhes concedem resistência térmica reconhecidamente superior às formas imperfeitas normalmente encontradas. (SCOTT & BERNARD, 1987; SPLITTRSTOESSER et al., 1971; VAN DER SPUT et al, 1975).

As espécies foram escolhidas por terem sido citadas freqüentemente, na literatura, como deterioradoras de sucos e outros produtos pasteurizados de frutas.



(HOCKING & PITT, 1984; SCOTT & BERNARD, 1987; KING et al, 1969; BEUCHAT & TOLEDO, 1977; KAVANAGH et al., 1963; KING & HALBROOK, 1987; BEUCHAT, 1986).

#### **4.3 Produção de Ascósporos**

Para o cálculo de resistência térmica, foi necessária prévia produção de ascósporos, que são as estruturas termo-resistentes apresentadas por estes fungos filamentosos.

Primeiramente, foram colocados 12 ml de B.D.A. (Meio Batata Dextrose Agar), em anexo, em 12 tubos, autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

A produção de ascósporos foi obtida através do cultivo dos fungos em tubos inclinados contendo BDA, incubados a 30°C por 7 dias (em média) ou até a visualização de ascos e ascósporos nas culturas (sob o microscópio).

A seguir, repicado da placa contendo o fungo filamentoso, com alça de platina próximo à chama (6 tubos para cada tipo de fungo). Deixado incubar a 30°C por 1 semana.

Após uma semana, foi verificada a produção de ascos e ascósporos no microscópio. Caso não ocorra a produção, deixar mais alguns dias incubando.

Após este período foram preparadas suspensões dos ascos, adicionando-se aproximadamente 10ml de água estéril a cada tubo de cultura, seguida de agitação manual, para melhor retirada do material da superfície da ágar. A suspensão de esporos foi filtrada sob condições estéreis.

A seguir, foi retirado 1mL de cada suspensão, ativadas a 80°C durante 10 minutos, e inoculadas em 10 garrafas de Roux contendo 150mL de meio de cultura (B.D.A.) inclinado (para formar uma superfície maior). As garrafas foram incubadas a 20°C, 30°C e 40°C durante 4 a 6 semanas (tabela 2) como discutido por BAYNE & MICHENER (1979); KING et al. (1969); SCOTT & BERNARD (1987) adaptadas.

**TABELA 2 – Condições Utilizadas para a Esporulação dos Fungos Filamentosos**

<b>FUNGO</b>	<b>MEIO</b>	<b>pH</b>	<b>TEMPO DE INCUBAÇÃO</b>
<i>Byssochlamys nivea</i>	B.D.A.	5.6	6 Semanas
<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>	B.D.A.	5.6	4 Semanas

A observação da presença de ascósporos e ascos foi feita através de exame macroscópico, uma vez que a cultura torna-se arenosa quando há predominância destas estruturas, e de exame microscópico de lâminas preparadas com o material das garrafas.

#### **4.4 Coleta dos Ascósporos**

A coleta dos ascósporos da superfície do meio, foi feita pela adição de pérolas de vidro e 40 ml de água estéril a cada garrafa, seguido de agitação manual. A suspensão foi filtrada através de várias camadas de gase estéril e centrifugada a 5000rpm por 15 minutos. Para completar a limpeza, foram efetuadas duas centrifugações com água estéril. O precipitado foi ressuspendido em água estéril.

#### 4.5 Ativação dos Ascósporos

Foi utilizado como referência o tempo e temperatura determinada por ARAGÃO (1989), onde foram construídas curvas de ativação térmica usando suco de morango como meio de aquecimento. Segundo este trabalho, foi determinado como ideal tanto para o *Byssochlamys nivea* como para o *Talaromyces flavus*, a ativação dos esporos a 80°C por 5 minutos.

#### 4.6 Determinação do Tempo de Elevação da Temperatura

Tubos foram preenchidos com a quantidade adequada de amostra (3,0 ml): inseriu-se um termopar cobre-constantan (tipo HP 34401A), estando a sua junta de medida no centro do volume ocupado pela amostra. Este conjunto assim montado foi colocado em banho termostatizado ajustado à temperatura de interesse acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a amostra atingiu a temperatura desejada (monitoramento através do termopar), registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro como tempo necessário à elevação da temperatura. Os tempos obtidos para diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 3.

**TABELA 3 – TEMPO NECESSÁRIO PARA OBTENÇÃO DAS TEMPERATURAS DE INTERESSE NO INTERIOR DO TUBO TDT (Temperatura Ambiente 23°C)**

<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TEMPO (minutos)</b>
80	1, 63
85	1,72
90	1,75
93	1,78

Legenda: Determinado como descrito no item 4.6.

## **4.7 Determinação da Resistência Térmica**

### **4.7.1 Métodos de Tubos TDT**

O método utilizado para a construção destas curvas foi o método de tubos TDT – Thermal Death Time, desenvolvido por BIGELOW & ESTY (1920) e citado por STUMBO (1973). Foi adicionado 0,3 mL de suspensão de ascósporos ou ascos a 2,7 ml de suco de maçã previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C , e distribuído em tubos TDT estéreis. Os tubos foram fechados com algodão estéril e papel laminado e submetidos ao choque térmico em banho-maria a 80°C por 5 minutos mais o tempo de elevação da temperatura determinada como descrito em 4.6.

A seguir, seguiu-se ao aquecimento, em banho-maria, dos tubos segundo a temperatura e tempo apresentados na Tabela 4.

**TABELA 4 – TEMPERATURAS E TEMPOS DE AQUECIMENTO UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TERMICA DAS CEPAS SELECIONADAS ESTUDADAS**

<b>ESPECIE</b>	<b>TEMPERATURA DE AQUECIMENTO (°C)</b>	<b>TEMPO DE AQUECIMENTO (MINUTOS)</b>
<i>B. nivea</i>	85	0, 30, 60, 80, 100, 120, 140, 150, 160
	90	0, 5, 20, 25, 30, 40, 60
	93	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12
<i>T. flavus</i>	80	0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80
	85	0, 5, 10, 15
	90	0, 0,5, 1, 1,5 , 2

Após os tempos requeridos, as amostras foram resfriadas, diluídas e plaqueadas em duplicata, em profundidade, em meio B.D.A. acrescido de 1% (v/v) da solução de rosa de bengala a 0,083% (p/v).

As placas foram incubadas a 30°C e as contagens de sobreviventes foram realizadas após um período de incubação de 3 a 7 dias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de Estrutura de Resistência

#### *Byssochlamys nivea*

*B. nivea* foi incubado a temperaturas de 20, 30, 40°C. Na temperatura de 20°C observou-se crescimento com colônias menos densas, porém ocupando toda a superfície do frasco de Roux. A 30°C, houve um crescimento bastante acentuado, também ocupando toda a superfície do frasco de Roux. Entretanto, para os fungos incubados a 40°C o crescimento foi muito reduzido, não sendo suficiente para a formação de ascos ou ascósporos suficientes para a realização dos testes de resistência térmica.

#### *Talaromyces flavus*

Comportamento similar ao do *B. nivea* foi observado para o *T. flavus* o qual a 20°C, apresentou crescimento com colônias mais espessas, porém ocupando toda a superfície do frasco de Roux, enquanto a 30°C, houve um crescimento bastante acentuado. Entretanto, para o *T. flavus* não foi observado nenhum crescimento a 40°C.

A seguir, foram realizadas diluições e plaqueamento em meio B.D.A., incubados à 30°C durante 7 dias, para avaliação da concentração de esporos. Com os resultados obtidos, verificados na tabela 5, observa-se, entretanto, que as suspensões estavam com baixa concentração de esporos, pois o ideal é que se obtenha, pelo menos 4 reduções decimais na curva de sobreviventes.

**TABELA 5 – CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DE *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* (UFC/mL) NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO**

	<b>BYSSOCHLAMYS NIVEA</b>		<b>TALAROMYCES FLAVUS</b>	
Temperatura (°C)	20°C	30°C	20°C	30°C
Conc. de esporos (UFC/mL)	17000	1700	18000	2400

## 5.2 Avaliação Microscópica

Através da observação por microscopia da presença de ascósporos e ascos observou-se que o *Byssochlamys nivea* apresentou a grande maioria de suas estruturas na forma de ascos. Uma vez que vários métodos para romper os ascos e liberar os ascósporos não obtiveram sucesso como relatado por ARAGÃO (1989), optou-se por trabalhar com ascos, como estrutura de resistência, para *B. nivea*.

Observou-se que, para o *T. flavus*, os ascósporos já se apresentaram livres, praticamente sem a ocorrência de ascos, que, quando presentes são facilmente rompidos.

### 5.3 Avaliação da Resistência Térmica de Ascospores de *Byssoschlamys nivea* em Suco de Maçã

A figura 5 mostra a curva de sobreviventes de ascospores de *Byssoschlamys nivea* para as duas temperaturas de incubação utilizadas (20 e 30°C). Nota-se que, principalmente a de 30°C, não há linearidade da curva de sobrevivência. Observa-se no início da curva, “ombro”, caracterizado pela lenta diminuição do número de sobreviventes, seguido de uma taxa de morte acelerada (parte logarítmica da curva).

ARAGÃO (1989) apresentou curvas características da não linearidade à temperatura de 80°C, concluindo que com aumento da temperatura, as curvas tornam-se praticamente lineares.

Segundo KING et al (1979) e BAYNE & MICHENER (1979), trabalhando com linhagens de *Byssoschlamys*, as altas temperaturas mascaram a não linearidade das curvas, sendo necessário a utilização de temperaturas mais baixas para evidenciar este fenômeno. Este comportamento não é semelhante ao relatado na literatura, na qual se observa que a curva de inativação térmica de fungos não é logarítmica.

ARAGÃO (1989) relata que uma explicação para a não linearidade das curvas de sobreviventes de ascospores de *Byssoschlamys nivea*, seria o fato de que os ascósporos encontram-se dentro de ascos íntegros, e que a destruição destes ascósporos não seria uniforme.

Estas observações indicaram que a forma mais correta para o cálculo dos parâmetros de esterilização é a aplicação deste método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970). Para possibilitar o cálculo dos parâmetros de



esterilização equivalentes a D e Z, que só podem ser calculados para curva de destruição logarítmica, aplicou-se o método de linearização de curvas de sobreviventes de ALDERTON & SNELL (1970), conforme aplicado para determinação de resistências térmicas de fungos filamentosos (KING et al., 1969; BEUCHAT, 1986; ARAGÃO, 1989; KOTZEKIDOU, 1997).

A figura 6 mostra o gráfico de  $\log(\log N_0 - \log N) \times \log \text{tempo (minutos)}$  para ascos de *Byssoscllamys nivea* produzidos a 20°C, sob aquecimento a 85°C. O inverso da inclinação desta curva fornece o expoente de linearização “a”, utilizado na equação de linearização:  $(\log N_0 - \log N)^a = Kt + C$

Onde:

$N_0$  = Concentração inicial de ascósporos/mL

$N$  = Concentração de sobreviventes/ mL (após um tratamento térmico de t minutos)

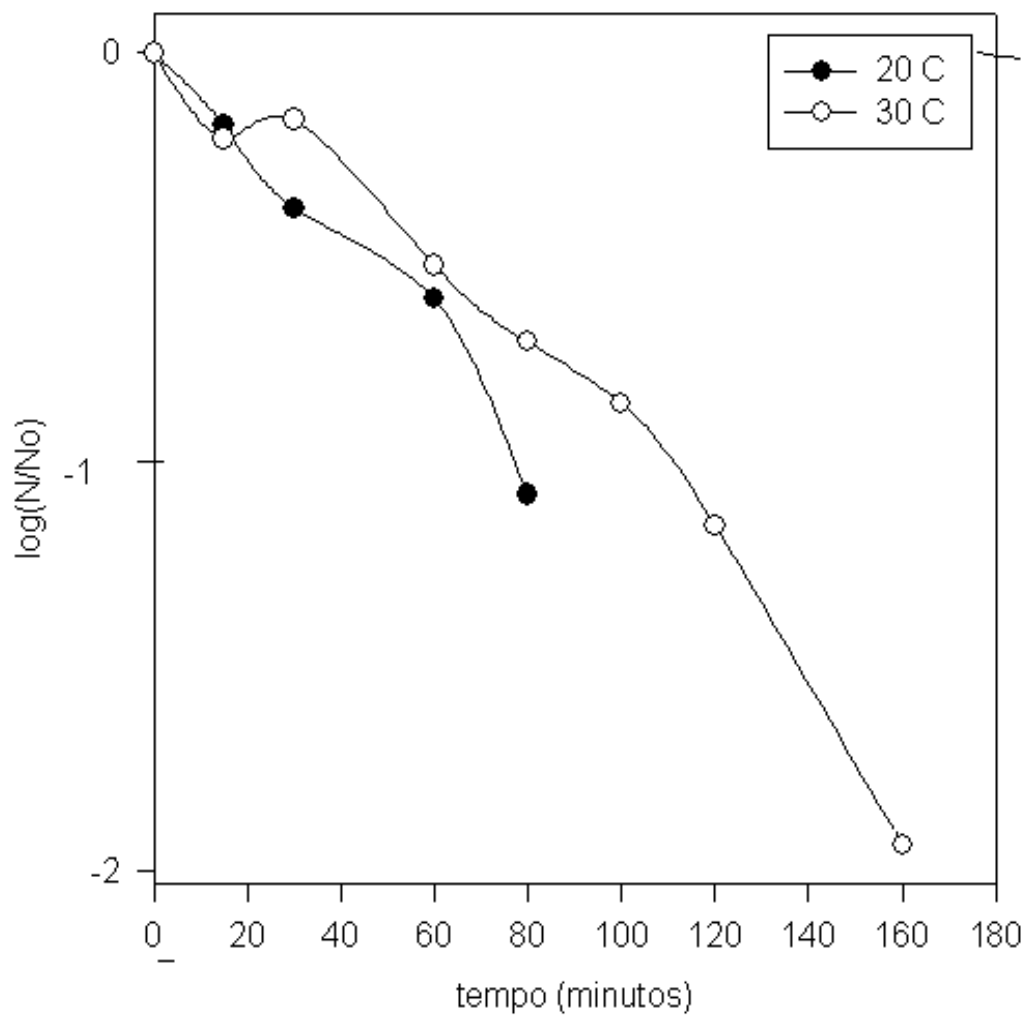
$a$  = parâmetro para linearização (expoente)

$K$  = Constante de taxa de morte (coeficiente angular da curva linearizada)  
( $\text{min}^{-1}$ )

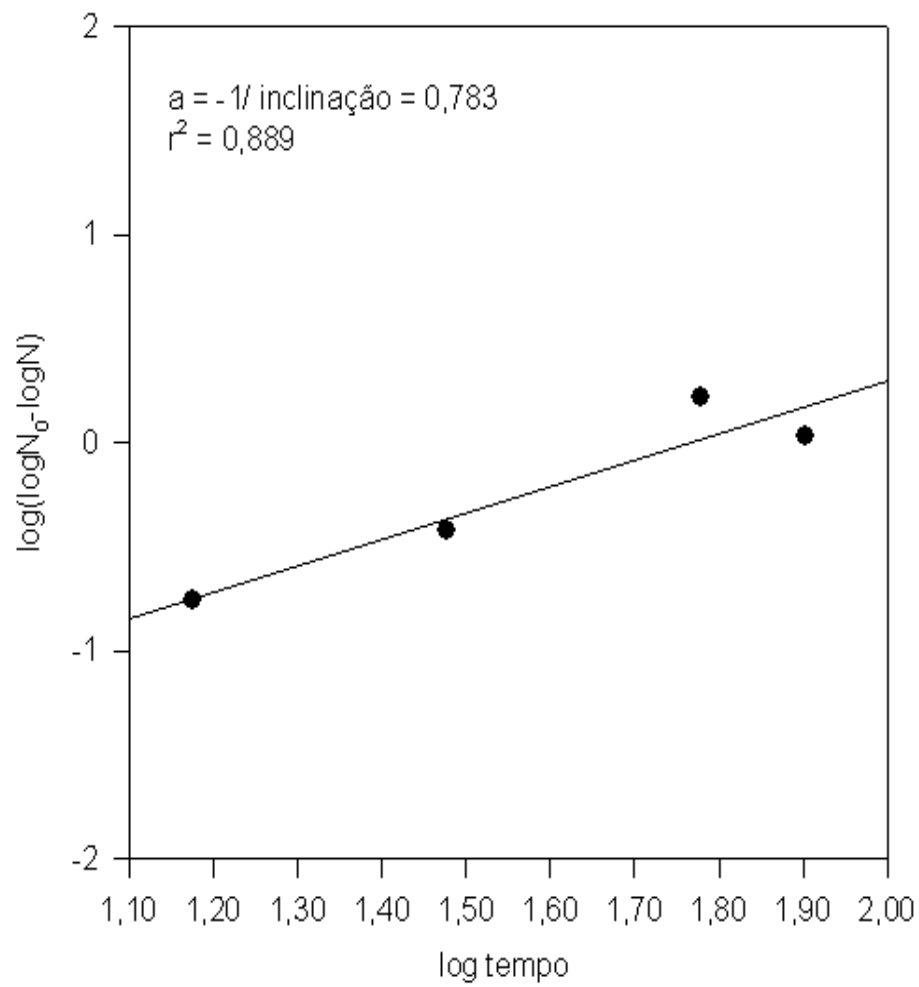
$C$  = Coeficiente linear da curva linearizada

$t$  = (min)

O valor de “a” obtido para 85°C foi de 0,783. Este valor foi utilizado para linearizar as curvas de sobreviventes a 85°C e 90°C de *B. nivea*, cultivado a 20°C.



**Figura 5 – Curva de sobreviventes de ascos de *B. nêvea*, produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 85°C.**



**Figura 6 – Cálculo de “a” para *B. nêvea* (20°C) aquecido a 85°C.**

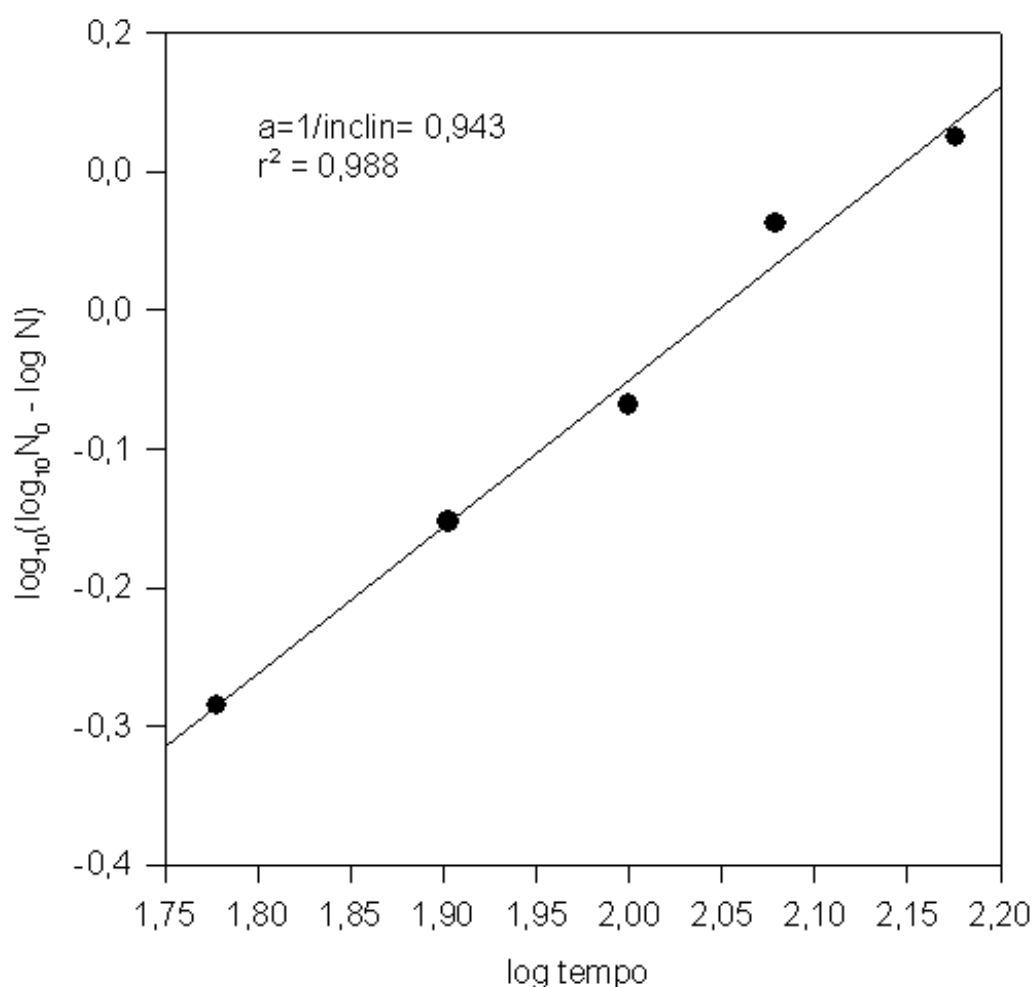


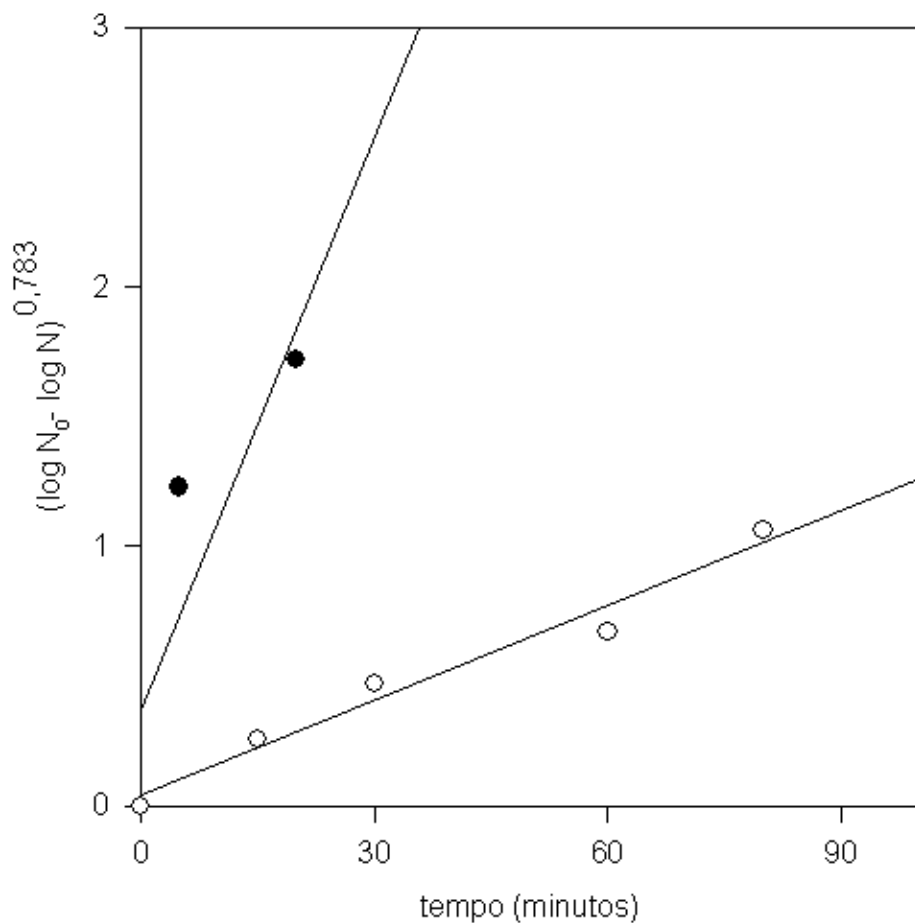
Figura 7 – Cálculo do expoente “a” para *B. nivea* (30°C) aquecido a 85°C.

**TABELA 6 – VALORES DE K, 1/K E  $r^2$  CALCULADOS PARA CADA TEMPERATURA DE TRABALHO COM *BYSSOCHLAMYS NIVEA***

TEMP. (°C) INCUBAÇÃO	TEMP. (°C) AQUECIMENTO	K	1/K	$r^2$
20	85	0,0122	81,97	0,971
	90	0,0737	13,57	0,750
30	85	0,0102	98,04	0,960
	90	0,0381	26,25	0,706

As curvas linearizadas são mostradas na figura 8 e 9. As equações regressionadas de cada curvas de sobreviventes são apresentadas sob os gráficos.

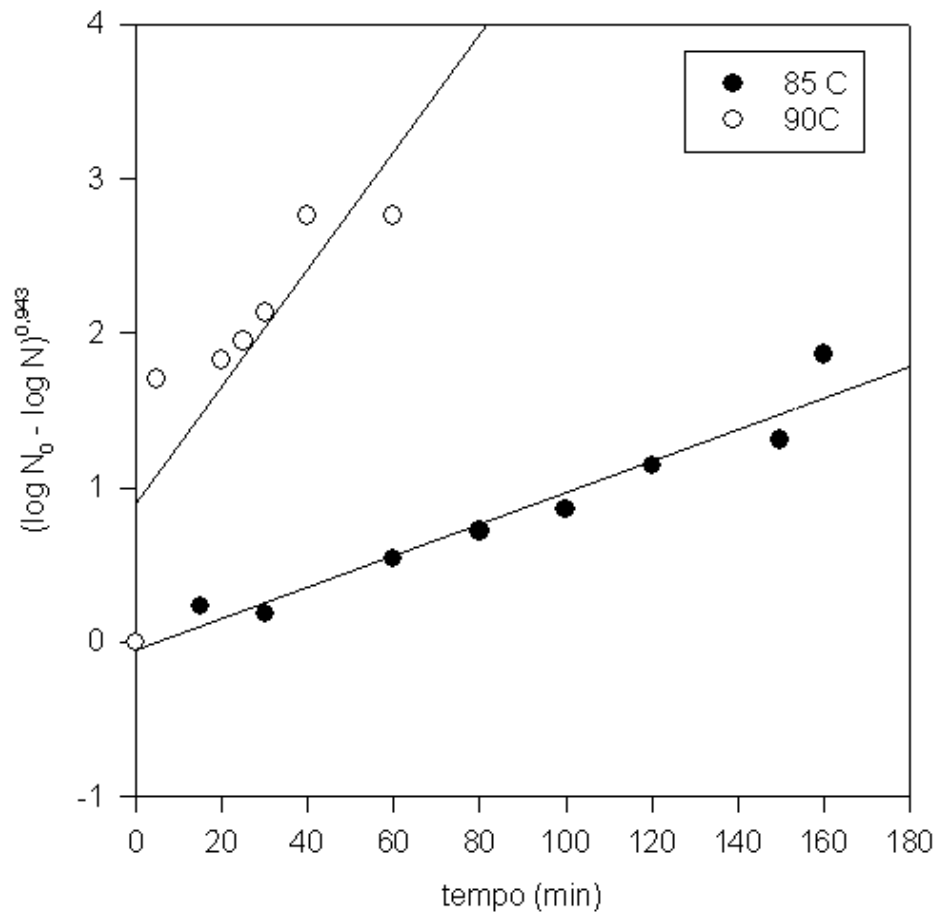
Os valores de  $k$ ,  $1/k$  (equivalente a  $D$ ) e  $r^2$  para as diferentes temperaturas são apresentadas na tabela 6.



$$(85\text{ C}) (\log N_0 - \log N)^{0,783} = 0,0122 t + 0,041 \quad (r^2 = 0,971)$$

$$(90\text{ C}) (\log N_0 - \log N)^{0,783} = 0,0737 t + 0,37 \quad (r^2 = 0,750)$$

**Figura 8 – Curva de sobreviventes de ascas de *B. nívea* produzidos a 20°C linearizadas**



$$(85^{\circ}\text{C}) \quad (\log N_0 - \log N)^{0.943} = 0,0102t - 0,047 \quad r^2 = 0,9498$$

$$(90^{\circ}\text{C}) \quad (\log N_0 - \log N)^{0.943} = 0,0381t + 0,896 \quad r^2 = 0,706$$

**Figura 9 – Curva de sobreviventes de ascos de *B. nivea* produzidos a 30°C linearizadas.**

A figura 10 apresenta as curvas de sobrevivência de ascósporos de *Byssoschlamys nivea* produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 85°C e linearizado por regressão linear. Esta linearização foi realizada para possibilitar a comparação do método, considerando ordem logarítmica de morte, que possibilita o cálculo do valor

D (KING et al., 1969 E BEUCHAT, 1986), com o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970).

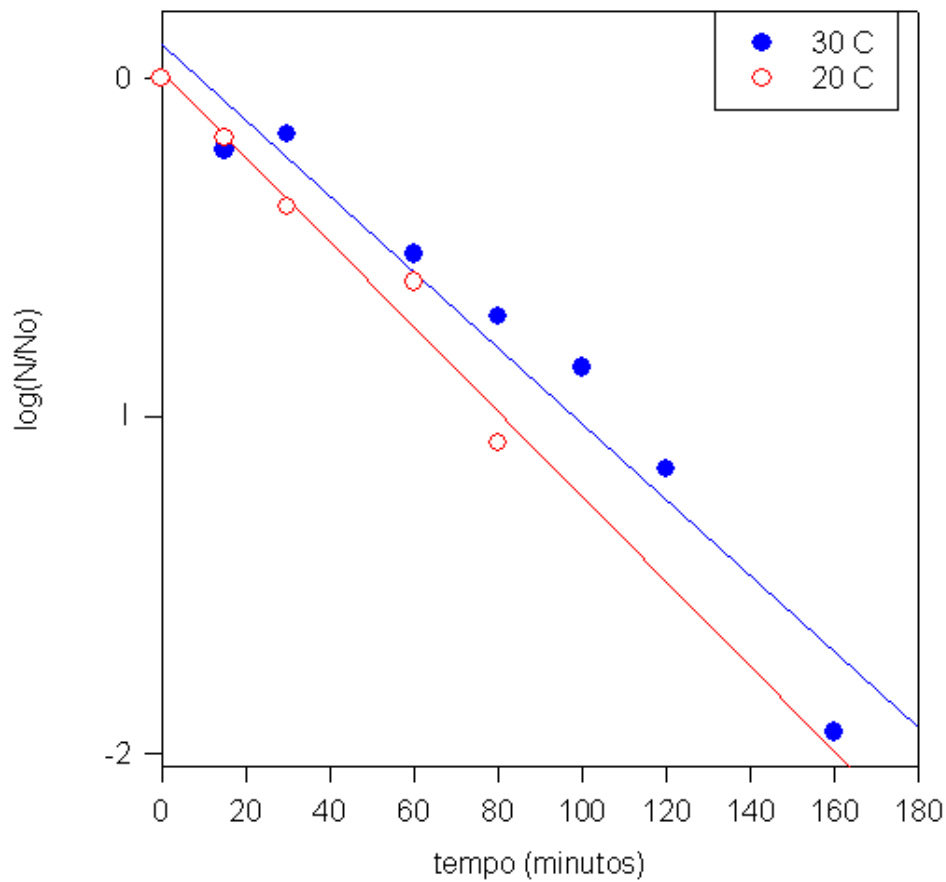
Os valores obtidos para  $1/K$ , D e seus respectivos  $r^2$ , podem ser obtidos na tabela 7.

**TABELA 7 – VALORES DE  $1/K$ , D E SEUS RESPECTIVOS  $r^2$  A  $85^{\circ}\text{C}$**

TEMP. DE INCUBAÇÃO ( $^{\circ}\text{C}$ )	D (MINUTOS)	$1/K$ (MIN)	$r^2$
20	79,4	81,9	0,961
30	90,9	98,0	0,950

Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação por este método de linearização, são muito próximos aos obtidos para o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970).

Observa-se ainda que os valores obtidos de  $1/k$  pelo método de ALDERTON & SNELL (1970), são maiores do que os valores de D obtidos.



20 C	$D_{85} = 79,4 \text{ min}$	$r^2 = 0,961$
30 C	$D_{85} = 90,9 \text{ min}$	$r^2 = 0,950$

**Figura 10 – Curvas de sobreviventes de ascos de *B. nívea* aquecidos a 85°C e linearizadas por regressão linear.**

Estes dados levam a concluir que, para se comprovar a necessidade de linearização pelo método ALDERTON & SNELL (1970), seria necessário realizar experimentos de resistência térmica a temperaturas inferiores do que as apresentadas neste trabalho.

Com os dados disponíveis até o momento, e considerando que:



1 – a literatura relata inúmeros trabalhos que mostram a não linearidade das curvas de sobreviventes de ascos de *Byssoschlamys nivea*;

2 – a segurança do processo, onde deve ser considerado o maior valor de resistência térmica obtido;

Conclui-se que devem ser utilizados os dados obtidos pelo método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) para valores equivalentes a D.

Em todas as temperaturas trabalhadas, a resistência térmica dos ascos produzidos a 30°C foi superior à resistência térmica dos ascos produzidos a 20°C, mostrando que a maior temperatura de incubação leva à maior resistência térmica dos esporos.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram os dados da literatura com relação à temperatura, onde se observa que a maior resistência foi obtida para maior temperatura de incubação (30°C).

#### **5.4 Avaliação da Resistência Térmica de Ascósporos *Talaromyces Flavus* em Suco de Maçã**

A figura 11 mostra as curvas de sobrevivência de ascósporos de *Talaromyces flavus* produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 80°C e linearizados por regressão linear.

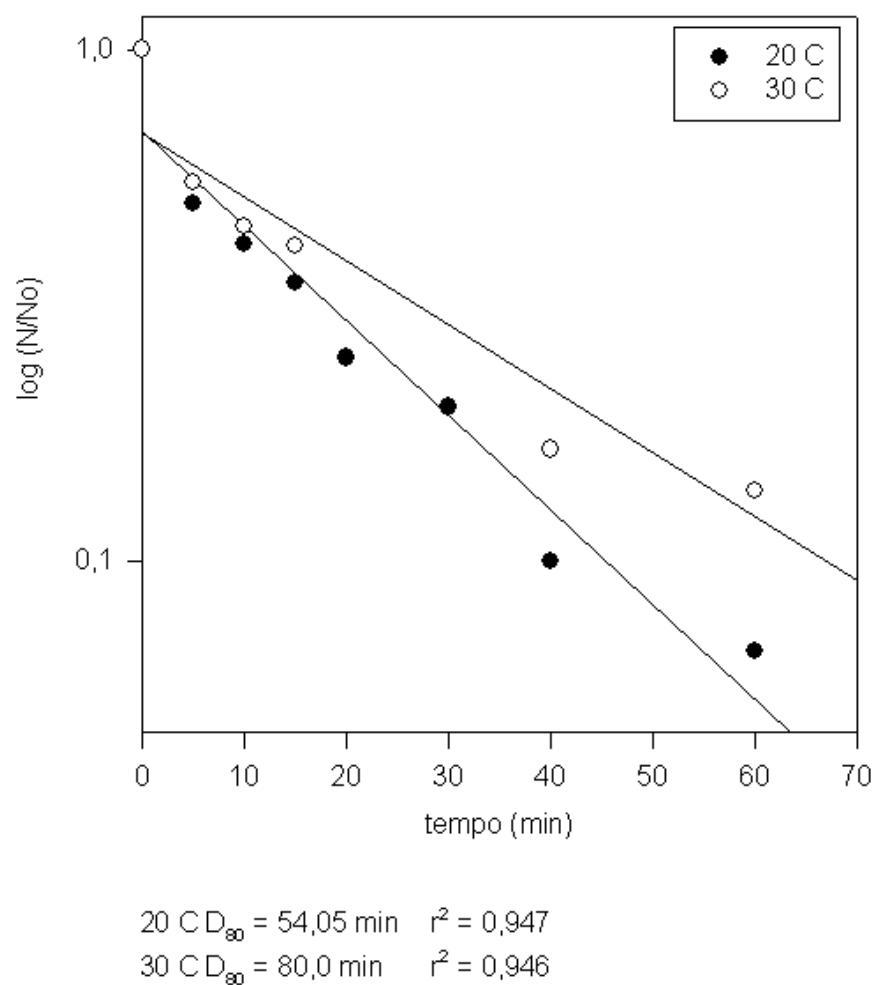
ARAGÃO (1989), trabalhando com *Talaromyces flavus* em suco de morango, não observou muita diferença entre os resultados obtidos pelos métodos de linearização por regressão linear e linearização por ALDERTON & SNELL (1970), para este fungo.

Como os dados obtidos no presente trabalho não mostraram claramente um comportamento não logarítmico, foi feita a linearização por regressão linear com conseqüente cálculo de D para este fungo.

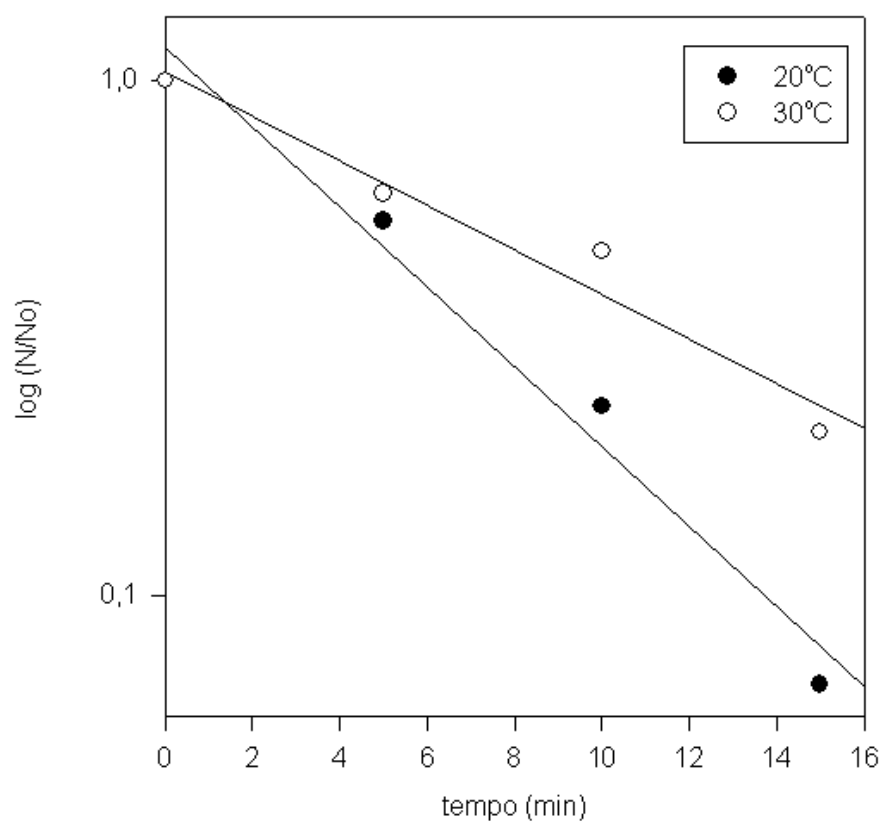
Os valores obtidos para  $D_{80}^0$  para os ascósporos produzidos a 20 e 30°C foram 54,05 e 80,0 minutos, respectivamente.

O mesmo comportamento foi observado para as outras temperaturas de aquecimento.

As figuras 12 e 13 mostram as curvas de sobreviventes de ascósporos de *Talaromyces flavus* produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 85 e 90°C, respectivamente.



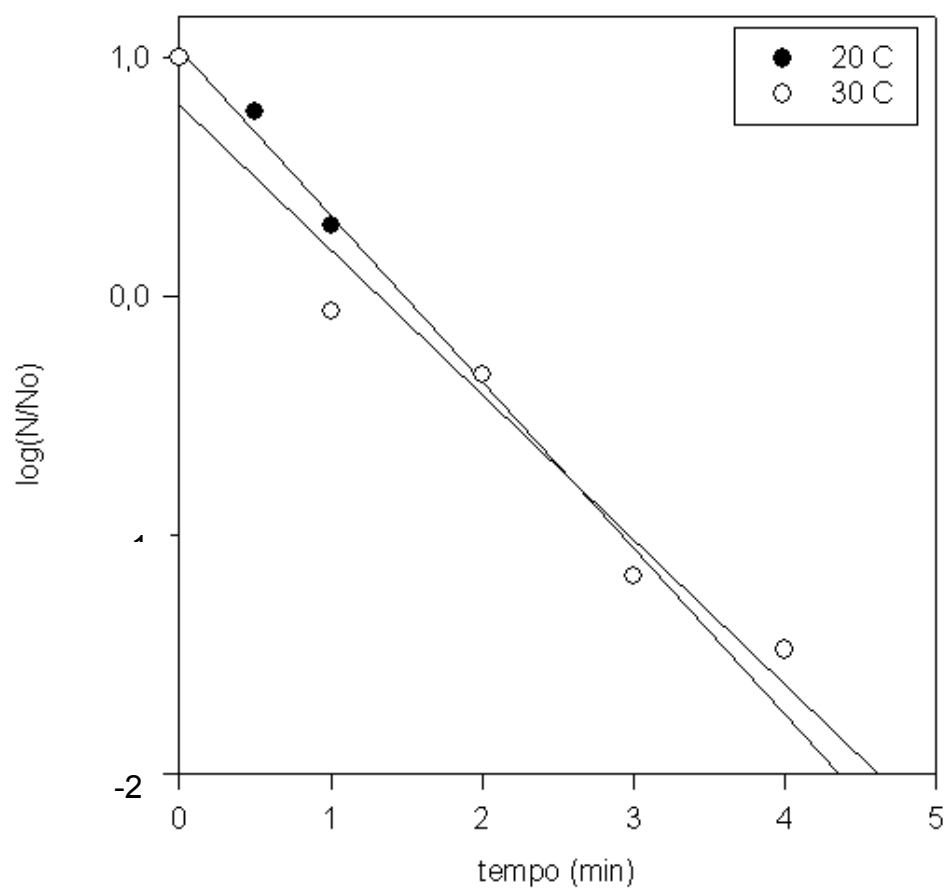
**Figura 11 – Curvas de sobreviventes de ascósporos de *T. flavus*, produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 80°C e linearizados por regressão linear.**



$$D(30) = 23,64 \text{ min } r^2 = 0,957$$

$$D(20) = 12,89 \text{ min } r^2 = 0,976$$

**Figura 12 – Curva de sobreviventes de ascósporos de *T. flavus* produzidos a 20 e 30°C e aquecidos a 85°C.**



20°C D = 1,43 min  $r^2 = 0,957$

30°C D = 1,64 min  $r^2 = 0,959$

**Figura 13 – Curva de sobreviventes de ascósporos de *T. flavus*, produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 90°C.**

A tabela 8 mostra os valores de D obtidos às temperaturas de 80, 85 e 90°C para ascósporos de *Talaromyces flavus* produzidos a 20 e 30°C.

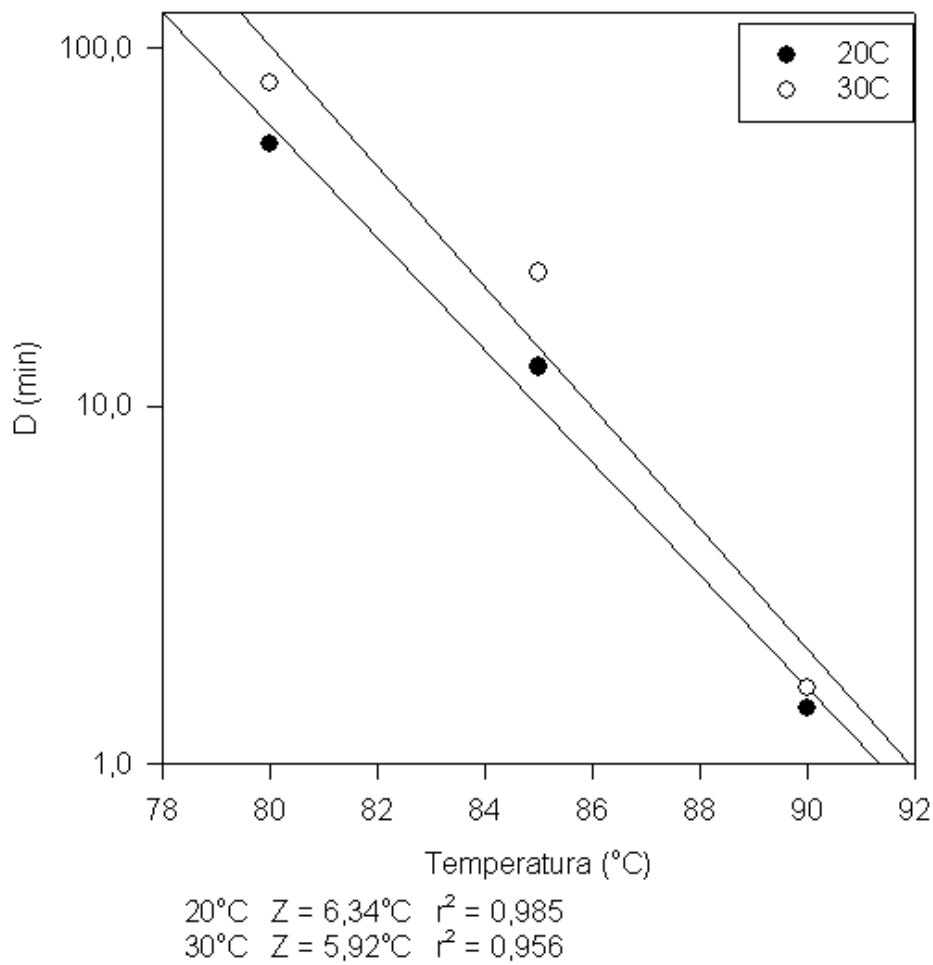
**TABELA 8 – Valores de D Calculados para cada Temperatura de Trabalho com *Talaromyces Flavus* Incubados a 20 e 30°C**

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO °C	TEMPERATURA DE AQUECIMENTO °C	D MINUTOS
20	80	54,05
	85	12,89
	90	1,43
30	80	80,0
	85	23,64
	90	1,64

O mesmo comportamento observado para o *Byssochlamys nivea*, onde a maior temperatura de incubação levou à maior resistência térmica, foi obtido para o *Talaromyces flavus*, como pode ser observado na tabela acima.

A figura 14 apresenta o cálculo do valor de Z, considerando os valores de D obtidos nas três temperaturas estudadas. Os valores obtidos para ascospores produzidos a 20 e 30°C foram respectivamente, de 6,34 e 5,92°C.

SCOTT & BERNARD (1987), apresentaram o intervalo de variação do valor de Z para o *Talaromyces flavus* de 5,2 a 12,9°C, próximos aos valores obtidos neste trabalho.



**Figura 14 – Cálculo do valor de Z para *T. flavus* produzidos a 20 e 30°C.**

Para verificar se o método de linearização de ALDERTON & SNELL (1970) pode descrever melhor a destruição térmica dos ascósporos deste fungo, este método foi utilizado para linearização da curva de sobrevivência.

A figura 15 mostra o cálculo de “a” para a temperatura de 80°C, valor que será utilizado para linearizar a curva de sobreviventes nesta temperatura e nas temperaturas maiores (85 a 90°C). A figura 16 mostra as curvas linearizadas dos ascósporos de *T. flavus* incubados a 20 e 30°C, respectivamente, e aquecidos a

80°C. As equações regressionadas de cada curva de sobreviventes são apresentadas sob os gráficos.

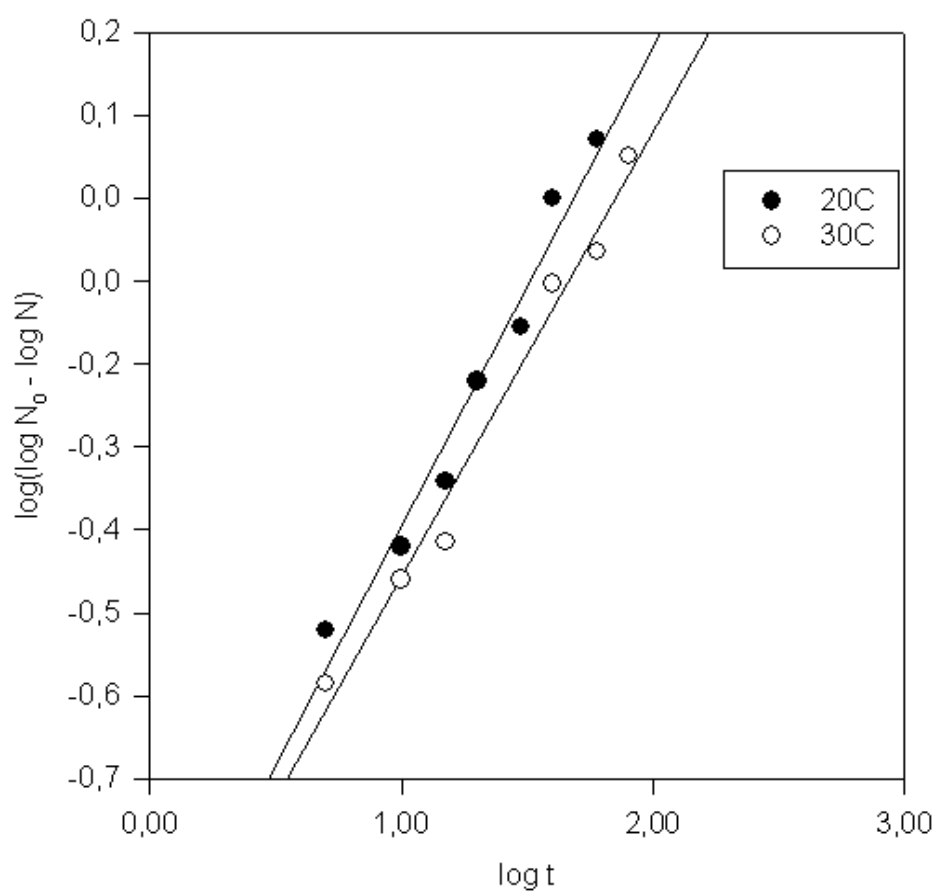
As figuras 17 e 18 mostram as curvas linearizadas dos ascósporos de *T. flavus* produzidos a 20 e 30°C, e aquecidos a 85 e 90°C, respectivamente.

Os valores de  $k$ ,  $1/k$  (equivalente a  $D$ ) e  $r^2$  para as diferentes temperaturas são apresentadas na tabela 9.

**TABELA 9 – VALORES DE  $K$ ,  $1/K$  E  $r^2$  CALCULADOS PARA CADA TEMPERATURA DE TRABALHO COM *T. flavus***

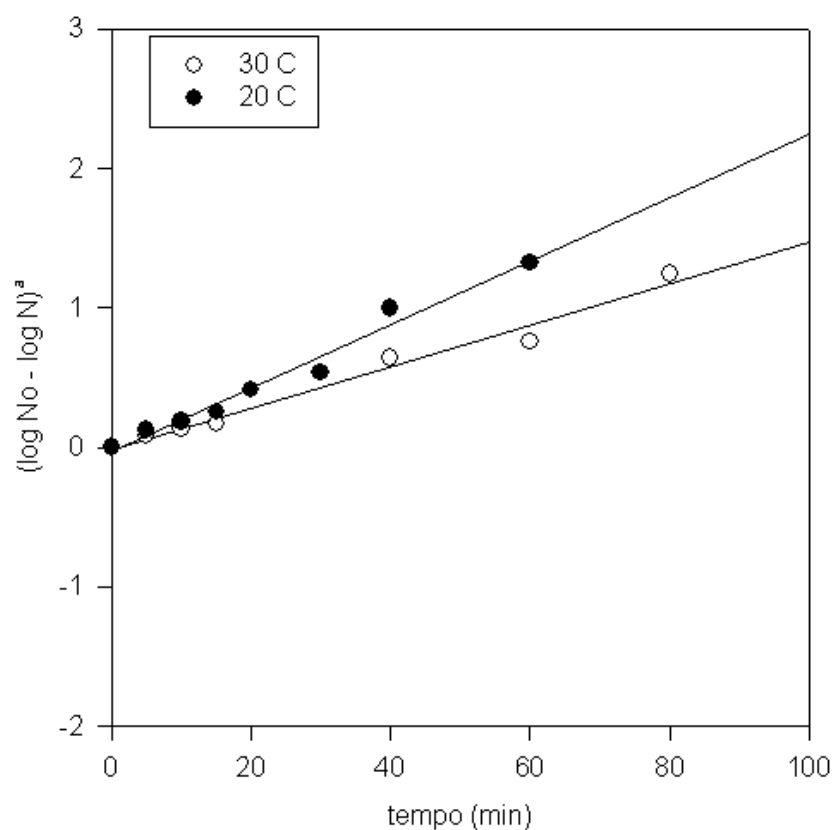
TEMP. (°C) INCUBAÇÃO	TEMP. (°C) AQUECIMENTO	K	1/K	$r^2$
20	80	0,0227	44,05	0,977
	85	0,0864	11,57	0,861
	90	0,5376	1,86	0,851
30	80	0,0149	67,10	0,980
	85	0,0309	32,36	0,810
	90	1,4000	0,710	0,957





20 C  $a = 1,73$   $r^2 = 0,968$   
 30 C  $a = 1,867$   $r^2 = 0,982$

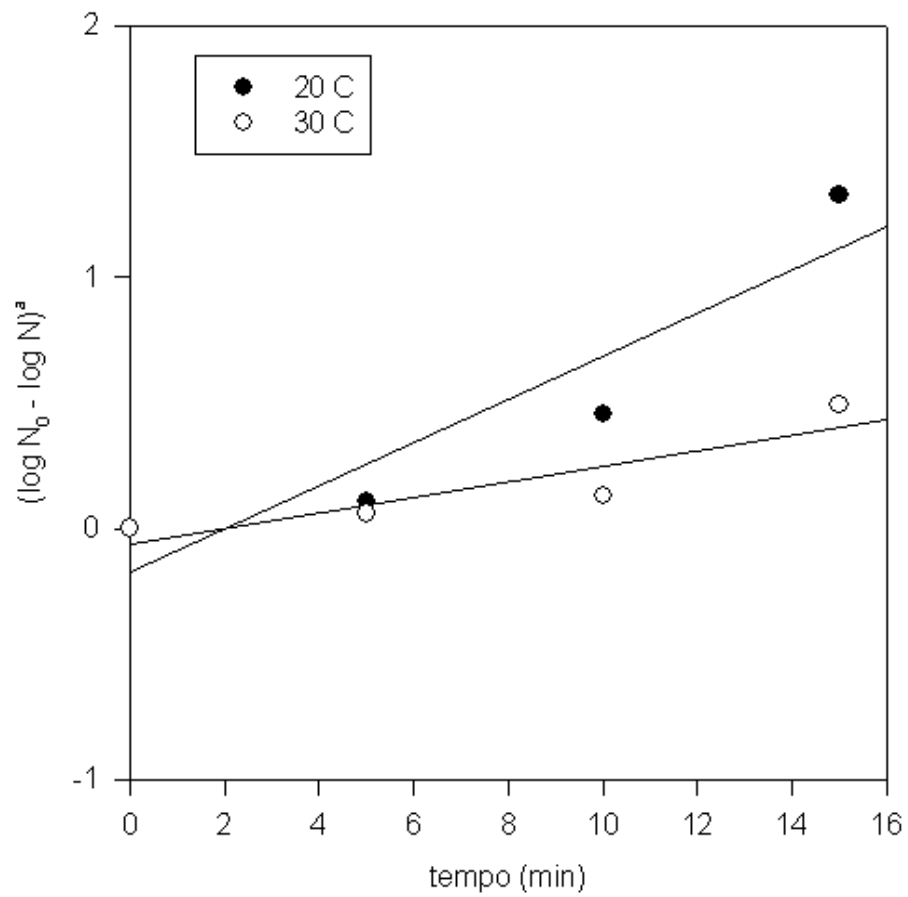
**Figura 15 – Cálculos do valor de “a” para *Talaromyces flavus* a 80°C.**



$$20\text{ C } (\log N_0 - \log N)^{1,73} = 0,0227 t - 0,031 \quad (r^2 = 0,977)$$

$$30\text{ C } (\log N_0 - \log N)^{1,867} = 0,0149 t - 0,013 \quad (r^2 = 0,9799)$$

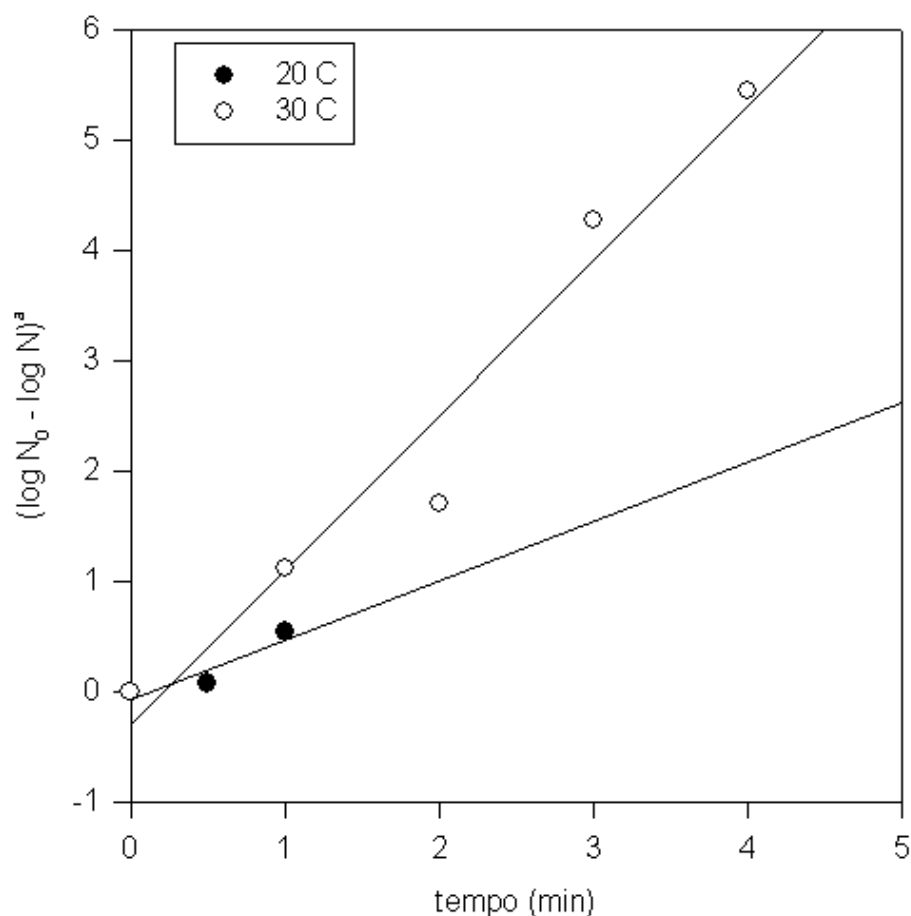
**Figura 16 – Curva de sobreviventes de ascósporos de *T. flavus* produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 80°C e linearizadas.**



$$20\text{ C } (\log N_0 - \log N)^{1,73} = 0,0864 t - 0,177 \quad r^2 = 0,861$$

$$30\text{ C } (\log N_0 - \log N)^{1,867} = 0,0309 t - 0,062 \quad r^2 = 0,810$$

**Figura 17 – Curva de sobreviventes de ascósporos de *T. flavus* produzidos a 20 e 30°C, aquecidas a 85°C e linearizadas**



$$(20^{\circ}\text{C}) (\log N_0 - \log N)^{1.73} = 0,538 t - 0,065 \quad r^2 = 0,851$$

$$(30^{\circ}\text{C}) (\log N_0 - \log N)^{1.867} = 1,403 t - 0,299 \quad r^2 = 0,957$$

**Figura 18 – Curva de sobreviventes de ascósporos de *T. flavus*, produzidos a 20 e 30°C, aquecidos a 90°C e linearizadas.**

Observando a tabela 10, onde compara os resultados de  $D$ ,  $1/k$  e  $r^2$ , obtidos pelos métodos de linearização por regressão linear e linearização por ALDERTON & SNELL (1970), calculados para cada temperatura de trabalho do *Talaromyces flavus*, incubados a 20 e 30°C, considerando que a segurança do processo, onde deve ser considerado o maior valor de resistência térmica obtido,

conclui-se que devem ser utilizados os dados obtidos pelo método de linearização por regressão linear com os valores de D.

**TABELA 10 - RESULTADOS DE D, 1/K E  $r^2$ , OBTIDOS PELOS MÉTODOS DE LINEARIZAÇÃO POR REGRESSÃO LINEAR E LINEARIZAÇÃO POR ALDERTON & SNELL (1970) PARA *TALAROMYCES FLAVUS***

		REGRESSÃO LINEAR		ALDERTON & SNELL	
Temperatura de Incubação (°C)	Temperatura de Aquecimento (°C)	D (min)	$r^2$	1/k (min)	$r^2$
20	80	54,05	0,947	44,1	0,977
	85	12,89	0,976	11,6	0,861
	90	1,43	0,957	1,86	0,851
30	80	80,00	0,946	67,1	0,980
	85	23,64	0,957	32,4	0,810
	90	1,64	0,959	0,71	0,957

Em todas as temperaturas trabalhadas, a resistência térmica dos ascósporos produzidos a 30°C foi superior à resistência térmica dos ascósporos produzidos a 20°C, confirmando o que relata a literatura.

Os resultados obtidos no *Talaromyces flavus*, também confirmaram estes dados da temperatura onde, a maior resistência foi obtida para maior temperatura de incubação.

## 6 CONCLUSÃO

1 - O fungo filamentoso *Byssochlamys nivea* apresentou maior resistência térmica em suco de maçã que o *Talaromyces flavus*, confirmando os resultados mostrados na literatura para outros sucos.

2 - Uma hipótese para a elevada resistência térmica do *Byssochlamys nivea* é a forma de suas estruturas de resistência que se apresentam como ascos íntegros de difícil destruição.

3 - Os esporos produzidos a temperaturas mais elevadas (30°C) foram mais resistentes do que os produzidos a 20°C.

4 - As curvas de sobreviventes de ascos de *B. nivea* não apresentam comportamento logarítmico de destruição, principalmente durante aquecimento a temperatura de 85°C, confirmando o resultado de ARAGÃO (1989). Foi então calculado o parâmetro de esterilização  $1/k$ , equivalente ao valor D na destruição logarítmica de morte.

5 - Para *T. flavus* o método de linearização que melhor descreveu a curva de sobreviventes foi à regressão linear, possibilitando o cálculo do valor D para diferentes temperaturas.

6 - Para ambos os fungos estudados, a resistência térmica apresentada é suficiente para resistir às temperaturas de pasteurização normalmente empregadas para suco de maçã (90 – 92°C por 20 – 60 segundos). Este tratamento não seria suficiente para provocar uma redução decimal do número inicial de ascósporos que podem estar presentes no suco. Portanto, o método de prevenção, como, seleção das frutas na preparação do suco e conservação, ainda é a melhor solução para eliminação de fungos filamentosos termo-resistentes, como os estudados neste trabalho.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDERTON, J. & SNELL, N. **Chemical states of bacterial spores:** heat resistance and its kinetics at intermediate water activity. Applied Microbiology. v. 19, 1970, p. 565-572.
2. ARAGÃO, M.F.G. **Identificação e determinação da resistência térmica de fungos termo-resistentes isolados de polpa de morango.** Campinas, 1989. Tese de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. Disponível em: [www.abpm.org.br](http://www.abpm.org.br), Acesso em: nov/04.
4. BANNER, M. J.; MATTICK, L. R. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Chemical composition of the ascospores of *Byssochlamys fulva*.** Journal of Food Science, v. 44, n. 2, 1979, p. 545-548.
5. BAGLIONI, F. **Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente.** Campinas, 1998. 94p. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
6. BAYNE, G.E.; MICHENER, D.H. **Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores:** applied and environmental microbiology, Washington, v.37, n.3, 1979, p.449-453.
7. BEUCHAT, L. R. **Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssochlamys nivea* ascospores.** Mycopathologia , v.59, n.3, 1976, p. 175-178. Apud: 13.



8. BEUCHAT, L. R. and TOLEDO, R. T, **Behaviour of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups**: Trans. Br. Mycol. Soc., 1977.
9. BEUCHAT, L.R. and Rice, S.L., ***Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits**, adv. Food Res., 1979.
10. BEUCHAT, L. R. **Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds**, Appl. Environ. Microb., 1981a.
11. BEUCHAT, L. R. **Synergistic effects of potassium sorbate and sodium benzoate on thermal inactivation of yeasts**. J. Food Sci., 1981b.
12. BEUCHAT, L.R., **Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products**. J. Food Sci., 1986.
13. BEUCHAT, L. R. **Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores**. Int. J. of Food Microb., 1988.
14. BEUCHAT, L. R.; PITT, J. I. **Detection and enumeration of heat resistant molds**. In: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. F. (Eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed., Washington: A.P.H.A., 1992.
15. BROWN, H.S. SMITH, G. **The genus *Paecilomyces* and its perfect stage *Bysschlamys* wetling**. Trans. Brit. Mycol. Soc. 40(11): 17-89, 1957.
16. BUTZ, P., FUNTENBERGER, S.; HABERDITZL, T. and TAUSCHER, B. **High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds**. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie. 1996.

17. CARTWRIGHT, P.; HOCKING, A. D. ***Byssochlamys* in fruit juices. Food Tech. In Aust.** 36(5): 210-211, 1984.
  
18. CASSELA, A.L.M.; MATASCI, F.; SCHIMIDT-LORENZ, W. **Influence of age, growth medium and temperature on heat resistance of *Byssochlamys nivea* ascospores. Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie.** v.23, n.5, 1990, p. 404-411.
  
19. CHANDER H.; KLOSTERMEYER, H. **Production of lipase by *Byssochlamys fulva*. J. of Food Protection.** 46(8): 707-709, 1983.
  
20. CHU, F.S. **Studies of the fungus *Byssochlamys fulva*. In: *Byssochlamys Seminar Abstracts*, Res. Circ. 20. Depto of Food Sci. And Tech. New York States Agric. Exp. Station, Geneva, Cornell University, N.Y. 3-4, 1969.**
  
21. CHU, F.S.; NEI, P. Y. W.; LEUNG, P. S. C. ***Byssochlamyopeptidase A*, a Renin-like enzyme produced by *Byssochlamys fulva*. Appl. Microb.** 25(2): 163-168, 1973.
  
22. CONNER, D.E. BEUCHAT, L.R. **Heat resistance os ascospores *Neosartorya fischeri*, as effected by sporulation and heating medium. International Journal of Food Microbiology.** v.4, 1987a, p.303-312.
  
23. CONNER, D.E. BEUCHAT, L.R. **Efficacy of media for promoting ascospores formation by *Neosartorya fischeri*, and the influence od age and culture temperature on heat resistance of ascospores. Food Microbiology,** v.4, 1987b, p.229-238.
  
24. DELGADO, Ap. Denise. **Ação esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados em laminado para embalagens assépticas.** Campinas, 2001. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas.

25. DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. **Thermal inactivation of conidia from *Aspegillus flavus* and *Aspergillus parasiticus***: Effects of moist heat, age conidia, and sporulation medium. *Journal of Milk food Technology*, Ames, v.38, p.678-682, 1975a.
  
26. DOYLE, M. P. MARTH, E. H. **Thermal inactivation of conidia from *Aspegillus flavus* and *Aspergillus parasiticus***: Effects of moist heat, age conidia, and sporulation medium. *Journal of Milk food Technology*, Ames, v.38, 1975b, p.750-758.
  
27. DRAGONI, I.; COMI, G. **Presenza di muffe e lieviti in succhi di frutta prodotti industrialmente**. *Indust. delle Bevande* 14(80): 599-601, 1985.
  
28. EIROA, M.N.U.; AMSTALDEN, V. C. **Ocorrência de espécies de *Byssochlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas**. *Col. ITAL, Campinas*. 15: 61 –70, 1985.
  
29. ENGEL, G.; TEUBER, M. **Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream**. *International Journal of Food Microbiology*. v. 12, 1991, p.225-234.
  
30. ENIGL, D.C.; KING Jr., A.D. & TOROK, T. ***Talaromyces trachyspermus*, a heat resistant mold isolated from fruit juice**. *Journal of Food Protection*. v. 56, n. 12, 1993, p.1039-1042.
  
31. FRAVEL, D.R. & ADAMS, P.B. **Estimation of United States and world distribution of *Talaromyces flavus***. *Mycologia*, v. 78, n.4, p.684-686, 1986.
  
32. GIRARDIN, H; LATGÉ, J. P. Comparison of *Neosartory fischeri* varieties based on profiles and immunoactivities. In: SAMSON, R. A. ; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; KING, D. A. *Modern methods in food mycology*. Amsterdam; Elsevier, 1986. P. 177-187.
  
33. GOLDONI, J. S; CEREDA, M. P; CEREDA, E; CAGLIARI, A. M. **Variação do teor de ácido ascórbico em suco integral durante armazenamento pelo frio:**

- I. Morango (Fragarin sp.). Assoc. Brás. Das Ind. De Alim. (A. B. I. A.): 24-30, (ago) 1981.
34. GUMERATO, F. H. **Desenvolvimento de um programa de computador par identificação de alguns fungos comuns em alimentos e determinação da resistência térmica de *Neosartorya fischeri* isolado de maçãs**. Campinas, 1995. 106p. Tese de Mestrado apresentada á Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
35. HANG, Y. D. and WOODAMS, E. E. **Characterization of glucoamylase from *Neosartorya fischeri***. *Lebensmittel: Wissenschaft und Technologie*, 26: 483-484, 1993.
36. HATCHER, W. S.; WEINW, J. L.; MURDOCK, D. I.; FOLINAZZO, J. F.; HILL, E. C.; ALBRIGO, L.G. **Growth requirements and thermal resistance of fungi Belonging to the enus *Byssoschlamys***. *J. Food Sci.* 44(1): 118-122, 1979.
37. HOCKING, A. D; PITT J. I. **Food Spailage fungi. II Heat: Resistant fungi**. CSIRU Food Res. Quart. 44: 73 – 82, 1984.
38. HULL, R. **Studies of *Byssoschlamys fulva* and control measures in processed fruits**. *Ann. Applied Biology*, v.26, p. 8000-822. 1939. APUD: HOCKING, A. D.; PITT, J.I. Food Spoilage Fungi. II. Heat Resistance Fungi. CSIRD Food Res., 1984.
39. JESENSKÁ, Z.; PEICKOVÁ, E; SEPITKOVÁ, J. **Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri* some ecologic considerations**. *Journal of Food protection, Ames*, v.54, n.8, p.582-584, 1991.
40. KATAN, T. **Heat of dormet ascopores of *Talaromyces flavus***. *Trans. Brit. Myco log. soc.* 84: 748 – 750, 1985.
41. KAVANAGH, J.; LARCHET, N.; STUART, M. **Occurrence of heat resistance species of *Aspergillus* in canned strawberries**. *Nature*, v.198, p.1322, 1963.

42. KING Jr., A.D.; MICHENER, H. D.; ITO, K. A. **Control of *Byssochlamys* and related heat-resistant fungi in grape products.** Appl. Microb. 18(2): 166-173, 1969.
  
43. KING Jr., A. D.; BOOTH, A. N.; STAFFORD, A. E.; WAISS Jr., A. C. ***Byssochlamys fulva*, metabolite toxicity in laboratory animals.** J. Food Sci. 37:86-89, 1972.
  
44. KING JUNIOR, D. A.; BAYNE, H. G.; ALDERTON, G. **Nonlogarithmic death rate calculations for *Byssoclamys fulva* and other microorganisms, Applied and enviromental microbiology.** v.37, n3, p. 596-600, 1979.
  
45. KING JUNIOR, D. A; HALBROOK, W. U. **Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate.** Journal of Food Science, Chicago, v.52, n.5, 1987.
  
46. KING JUNIOR, D. A; WHITEHAND, C. L. **Alteration of *Talaromyces flavus* heat resistance by growth conditions and heating medium composition.** Journal of Food Science. Chicago, v.55, n.3, p.830-836, 1990.
  
47. KOTZEKIDOU, P. **Heat of *Byssochlamys nivea*, *byssochlamys fulva* and *Neoartorya fischeri* isolated from canned tomato paste.** Journal of food Science, Chicago, v.62, n.2, p.410-412, 437, 1997.
  
48. MAGGI, A., GOLA, S.; SPOTI, E.; ROVERE, P.; MUTTI, P. **Trattamenti ad alta pressione di ascospore di muffe termoresistenti e di patulina in nettare di albicocca e in acqua:** Indústria conserve. Parma, anno 69, n.1, p.26-29, 1994.
  
49. MALLOCH, D.; CAIN, R. F. **The Trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces* and *Penicillium* imperfect states.** Canadian Journal of Botony. 50: 2613 – 2627, 1972.

50. MAUNDER, D. T. **Summary of work on spoilage problems caused by molds of the *Byssochlamys*: *Paecilomyces* group**, in *Byssochlamys* Seminar Abstracts, Res. Circ. 20, Dept. of Food Sci. and Tech., New York State Agric. Exp. Station, Geneva, Cornell University, N. Y., 1969.
  
51. MICHENER, D. H; KING Jr, D. **Preparation of free heat-resistant ascospores from *Byssochlamys* asci**. Applied Microbiology, Washington, v.27, p.671-673, 1974.
  
52. MURDOCK, D.I.; HATCHER, W. S. **A simple method to screen fruit juices and concentrates for heat resistant mold**. Journal of Food Protection, v.41, p. 254-256, 1978.
  
53. NIELSEN, P. V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J. C. **Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light, and water activity**. Appl. Environ. Microbiol, 54(6): 1504-1510, 1988.
  
54. NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. **Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids**. Journal of Applied Bacteriology, v. 66, p. 197-207, 1989a.
  
55. NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R.; FRISVAD, J.C. **Influence of atmospheric oxygen content on growth and fumitremorgin production by a heat resistant mold, *Neosartorya fischeri***. Journal of food Science, Chicago, v.54, n.3, p.679-682, 1989b.
  
56. NIELSEN, P. V.; SAMSON, R. A. Differentiation of food borne taxa of *Neosartorya*. In: SAMSON, R. A.; HOCKING, A. D.; PITT, J.I.; KING, D. A. Modern methods in food mycology. Amsterdam: Elsevier, p. 159-168, 1992.
  
57. NIELSEN, K. B.; NIELSEN, P. V. **Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing**. Journal of food Protection, Ames, v.59, n.3, p.268-275, 1995.

58. OBETTA, J. A. N. & UGWUANYI, J. O. **Shelf life study of some Nigerian fruit juices inoculated with ascospores of *Neosartorya* spp:** Departamento de Microbiologia, University of Nigeria. *Plant Foods for Human Nutrition* 50: 325-331, 1997.
  
59. OLLIVER, M; SMITH, G. ***Byssoschlamys fulva* sp.** Nov., *J. of Botany.* 71:196-197, 1933.
  
60. OLLIVER, M.; RENDLE, T. **A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssoschlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit.** *Journal of Society Chem. Ind, London* .v.53, p.166T, 1934. APUD: BEUCHAT, L. R.; RICE, S. L. *Byssoschlamys spp.* And their importance in processed fruit. *Adv. Food Res.* 25: 237-289, 1979.
  
61. OLIVEIRA, C.G.L. **TETRAPAK LTDA. Centro de Treinamento:** Departamento de Engenharia. Cap. *Peróxido de Hidrogênio*, p.113-123, 1988 (Catálogo).
  
62. PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*** Academic Press. London, 1979.
  
63. PITT, J. I. And HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**, Academic Press. Sydney, 1985.
  
64. PUT, H. M. C. **A selective method for cultivating heat-resistant moulds, particularly those of the genus *Byssoschlamys* and their presence in duth soil.** *J. Appl. Bact.* 27:59-64, 1964.
  
65. PUT, H. M. C.; KRUISWIJK, J. Th. **Desintegration and organoleptic deterioration of processed strawberries caused by the mould *Byssoschlamys nivea*.** *J. Appl. Bact.* 27(1): 57-58, 1964.
  
66. RAHN, O. **Injury and death of bacteria by chemical agents. Reprinted from *Biodinamica Monograph n 3*.** Biodinamica, Normandy, Missouri, 1945.

67. RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E.R.; ETHIRAJ, S. **Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit.** Journal of Applied Bacteriology, v.81, p.337-340, 1996.
  
68. REED, G. **Food Science and Technology.** A series of monographs. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, New York, 1975.
  
69. REPS, A.; POZNANSKI, S.; KOWALSKA, W. **Characteristics and biological properties of the milk – coagulating enzyme obtained from the mould. *Byssoschlamys fulva*,** Bull. Acad. Pol. Sci. 17: 535, 1969.
  
70. RICE, S. L.; BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R. E. **Patulin production by *Byssoschlamys* spp. in fruit juices:** Appl. Environ. Microbiol. 34(6): 791-796, 1977.
  
71. RICE, S.L. **Patulin production by *Byssoschlamys* spp. In: canned grape juice.** Journal of Food Science, v.45, p.485-488, 495, 1980.
  
72. ROLAND, J.O. & BEUCHAT, L.R. **Biomass and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO<sub>2</sub> and temperature.** Journal of Food Science, v. 49, p.402-406, 1984.
  
73. ROLAND, J.O. & BEUCHAT, L.R.; WORTHINGTON, R.E. & HITCHCOCK, H.L. **Effects of sorbate, benzoate, sulfur dioxide and temperature on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in grape juice.** Journal of Food Protection. v. 47, n.3, p. 237-241, 1984.
  
74. ROSENTHAL, A. & SILVA, J. L. **Alimentos sob pressão:** Engenharia de Alimentos, v. 14, p. 37 – 39, 1997.
  
75. SAMSON, R. A. ***Paecilomyces* and some allied hyphomycetes.** Studies in Mycology 6, Jun., 1974.



76. SAMSON, R.A.; van REENEN HOEKSTRA, .E. S. **Introdution to food micology**. 3 ed., p.203-203, 1988.
  
77. SAMSON, R.A .; HOEKSTRA, R.S.E.; HARTOG, B.J. Influence of pretreatment of raspberry pulp on the detection of heat resistant moulds. **In:** SAMSON, R. A.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; KING, D. A. *Modern methods in food mycology*, Amsterdam: Elsevier, p.155-158, 1992.
  
78. SCOTT, V. N.; BERNARD, D. T. **Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from commercial fruit juices**. *Journal of food Protection*, v.50, n.1, p. 18-20, 1987.
  
79. SCUSSEL, Vildes Maria. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.
  
80. SPLITTSTOESSER, D.F.; CADWELL, D.M.; MARTIN, M. **Ascospore production by *Byssochlamys fulva***. *Journal of Food Science*, Chicago, v.34, p.248-250, 1969.]
  
81. SPLITTSTOESSER, D.F.; KUSS, F. R. HARRISON, W.; PREST, B. D. **Incidence of heat-resistant molds in eastern orchards and vineyards**: *Applied Microbiology*, Washington, v.21, n.2, p.335-337, 1971.
  
82. SPLITTSTOESSER, D.F.; WILKINSON, M.; HARRINSON, W. **Heat activation of *Byssoclarmys fulva* ascospores**. *Journal Milk Food Tecnology*, Ames, v.35, n.7, p.339-401, 1972.
  
83. SPLITTSTOESSER, D.F.; DOWNING, D. L.; ROGER N. F.; MURDOCK, D. I. **Influence of the harvest method on contamination of fruit by *Byssochlamys* ascospores**. *Journal Milk Food Tecnology*, Ames, v.37, n.8, p.445-447, 1974.
  
84. SPLITTSTOESSER, D.F.; SPLITTSTOESSER, M.C. **Ascospores of *Byssochlamys fulva* compared with those of a heat- resistant *Aspergillus***. *Journal of Food Science*, Chicago, v.42, n3, p.685-688, 1977.

85. SPLITTSTOESSER, D.F. **Heat-resistant molds**: potential spoilers of apple products, Nystate Agric. Exp. Station, 1978.
  
86. SPLITTSTOESSER, D. F.; LAMMERS. J. M.; DOWNING, D.L. & CHUREY, J. J. **Heat resistance of *Eurotium herbariorum*, a xerophilic mold**. Journal of Food Science, v.54, n.3, p.683-685, 1989.
  
87. SPLITTSTOESSER, D.F.; CHUREY, J.J. **Reduction of heat resistance of *Neosartorya fischeri* ascospores by sulfur dioxide**. Journal of Food Science, Chicago, v.56, n3, p.876-877, 1991.
  
88. SPLITTSTOESSER, D.F.; CHUREY, J.J. Activation and germination of *Neosartorya* ascospores. In: SAMSON, R. A.; HOCKING, A.D.; PITT, J. I.; KING, D. A. Modern methods in food mycology. Amsterdam: Elsevier, p. 169-176, 1992.
  
89. SPLITTSTOESSER, D.F.; NIELSEN, P. V.; CHUREY, J. J. **Detection of viable ascospores of *Neosartorya***. Journal of Food Protection, v.56, n.7, p.599-603, 1993.
  
90. SPOTTI, E.; CASOLARI, A. **Indagine sul contenuto di catalasi di muffe gasogene e altri microrganismi**. Indústria Conserve, v.62, p.22-24, 1987.
  
91. SPOTTI, E.; QUINTARALLA, S. & MUTTI, P. **Contaminazione da spore fungine termoresistenti di frutta, pomodoro e loro derivati**. Industria Conserve, v. 6.7, p. 421-425, 1992.
  
92. STOLK, A. C.; SAMSON, R. A. **Studies on *Talaromyces* and related Genera. I. *Hamigera* Gen. Nov. and *Byssochlamys***, Persoonia, 6, 341, 1971.
  
93. STOLK, A.C.; SAMSON, R.A. **The ascomycete genus *Eupenicillium* and related *Penicillium* anamorphs**. Studies in Mycology, 23. March, 1983.

94. STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in food processing** 2.ed., Academic Press. New York, 1973.
  
95. SWANSON, K.M.J.; LEASOR, S.B.; DOWNING, D.L. **Aciduric and heat: resistant microorganisms in apple juice and cider processing operations.** J. Food Sci. 50: 336 – 339, 1985.
  
96. TOURNAS, V. **Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry:** Critical Reviews in Microbiology. Cleveland, v.20, n.4, p.243-263, 1994.
  
97. TOURNAS, V.; TRAXLER, R. W. **Heat resistance of *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate.** Journal of Food Protection, Ames, v.57, n.9, p.814-816, 1994.
  
98. VALLETRISCO, M.; RUGGIERI, G.; NIOLA, I.; RUGGIERI, P. **Considerazioni sullo stato di contaminazione da patulina di alcune conserve vegetali.** Industrie Alimentari, 21(200): 877-878, 883, 1982.
  
99. VAN DER RIET, W.B.; VAN DER WALT, W.H. **Effect of ionizing radiation on ascospores of three strains of *Byssoschlamys fulva* in apple juice.** J. Food Protection, 48(12): 1016 – 1018, 1985.
  
100. VAN DER SPUIJ, J. E.; MATHEE, F.N.; CRAFFORD, D.J. A. **The heat resistance of moulds *Penicillium vermiculatum* dangeard and *Penicillium brafeldianum* dodge in apple juice.** Phytophylactica, v.7, p. 105-108, 1975.
  
101. VICINI, E.; BARBUTI, S.; SPOTTI, E.; CAMPANINI, M.; CASTELVETRI, F.; GOLA, S.; MANGANELLI, E.; CASOLARI, A. **Alterazione di succhi di frutta determinata da muffe gasogene:** Industria Conserve. Parma, v.58, p.238, 1983.
  
102. YATES, A.R.; FERGUSON, W.F. **Observations on *Byssoschlamys nivea* isolated from cucumber brine.** Canadian. Journal of Botany v.41, p. 1599-1601, 1963.

103. YATES, A.R.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. **Growth of *Byssochlamys nivea* in various carbon dioxide atmospheres**. Can. J. Microbiol, 13: 1120-1123, 1967.
104. YATES, A.R.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. **Ascospore germination in *Byssochlamys nivea***. Can. J. of Microb, 14: 319-325, 1968.
105. YATES, A.R.; MOONEY, D.R. **Production of pectic enzymes by *Byssochlamys nivea***, Can. Inst. Food Sci. Technol. J.,1: 106-109, 1968.
106. YATES, A. R. **The occurrence of *Byssochlamys sp.* molds in ontário**: Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, p. 7, n.2, p.148-150, 1974.
107. Disponível em: [www.fraibugo.sc.gov.br](http://www.fraibugo.sc.gov.br). Acesso em: mar/2001.

**ANEXOS**  
**8.1, 8.2 e 8.3**

### 8.1 SOLUÇÃO DO CORANTE ROSA DE BENGALA

- Rosa de bengala ..... 8,3mg
- Água destilada ..... 10 mL

Dissolver o corante na água e posteriormente esterilizar por filtração, através de seringa Millipore estéril e coletar em tubo de rosca estéril.

### 8.2 MEIO BATATA DEXTROSE AGAR (B.D.A.)

- B.D.A. ....39g
- Água destilada .....1000mL

Dissolver em banho-maria e autoclavar a 121<sup>0</sup>C durante 15 minutos.

### 8.3 SUCO DE MAÇÃ

- Polpa de maçã .....300g
- Água destilada ..... 1000 mL
- Sacarose .....até que o suco atinja 12<sup>0</sup> Brix
- Acido Cítrico 10g/Litro.....até que o suco atinja pH 3,2
- pH ..... 3,2

Esterilizar em autoclave a 121<sup>0</sup>C por 15 minutos.